

# **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



## **TESIS DOCTORAL**

**Oportunidades terapéuticas más allá del cartílago en la artrosis de rodilla: una perspectiva fisiopatológica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Amanda Villavilla García**

Directores

Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca  
Raquel Largo Carazo  
Rodolfo Gómez Bahamonde

**Madrid, 2014**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



**Oportunidades terapéuticas más allá del cartílago  
en la artrosis de rodilla: una perspectiva  
fisiopatológica**

TESIS DOCTORAL

Amanda Villalvilla García

Madrid, 2014



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**

**Oportunidades terapéuticas más allá del cartílago  
en la artrosis de rodilla: una perspectiva  
fisiopatológica**

Memoria presentada para optar al grado de doctor por:

Amanda Villalvilla García

Licenciada en Biología

Directores:

Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca

Raquel Largo Carazo

Rodolfo Gómez Bahamonde

Laboratorio de Patología Osteoarticular

IIS – Fundación Jiménez Díaz

## **Agradecimientos**

*Después de casi cuatro años, he concluido una de las fases más importantes en la carrera investigadora: la elaboración de mi tesis doctoral. Esta etapa no habría podido completarla sin mis directores el Dr. Gabriel Herrero-Beaumont, la Dra. Raquel Largo y el Dr. Rodolfo Gómez, de los que he aprendido todo lo que sé sobre el campo de la Reumatología, desde lo más básico hasta lo más clínico que he podido abarcar, entendiendo lo que es la “investigación traslacional”. Gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de entrar en este extraordinario laboratorio.*

*También quiero dar las gracias a la Fundación Conchita Rábago, ya que ha financiado mi trabajo en este laboratorio con una Beca de Investigación sin la cual no habría podido realizar esta tesis.*

*Volviendo al laboratorio... He tenido muchos estupendos compañeros con los que he compartido más o menos tiempo durante estos años. En primer lugar, Ruddy, además de director has sido compañero y amigo, de ti he aprendido muchísimo, me has ayudado y me has enseñado todo lo que sabes, lo que te agradezco de todo corazón. Iván, Marta y Ane, con vosotros he compartido también todo este tiempo (o casi), hasta el final de esta etapa que termino. Habéis sido grandes compañeros y amigos, hemos compartido muchas risas pero también charlas de las que todos hemos terminado sabiendo un poquito más y entendiendo mejor las cosas. Me habéis ayudado mucho en este tiempo y juntos hemos aprendido a "jugar con pipetas". Y Sandra y Juan, habéis llegado más tarde, pero con esas risas y esos churros habéis hecho que este año y medio que hace que os conozco sea memorable. Sois todos estupendos y me alegro mucho de haber podido compartir estos años con gente tan alegre, simpática y dispuesta a ayudar en lo que necesites.*

*También dar las gracias a todos los que habéis pasado brevemente por el laboratorio, con los que he compartido menos tiempo, y a los compañeros que sois de otros laboratorios pero también me habéis ayudado de una u otra forma:*

*Alberto, Robbie, Paula, Jessica, Natalia, Antonio, Lidia, María José, Laura, James, Ausra, Martita, Ana, Adela... Con todos vosotros he disfrutado de buenos momentos dentro y fuera del laboratorio, durante más o menos tiempo, y a todos os guardo mucho cariño.*

*A mis queridísimas amigas Laura y Patri. Gracias por estar a mi lado siempre, en esos ratos echando unas risas, de fiesta o charlando, pero también cuando los momentos son más difíciles y hace falta el apoyo de unas amigas.*

*A toda mi familia, y especialmente a mi madre y mi hermana, gracias por animarme a seguir esta carrera, a hacer lo que me gusta, y ayudarme en todo lo he necesitado, sin vosotras no habría llegado hasta aquí. Gracias a mi padre, por quererme y confiar en mí: sé que estarías orgulloso de este día.*

*Y por último, guardo estas líneas para agradecer a Edu, por tu apoyo y tu amor durante estos años, por escucharme y ayudarme a cada momento, y por haber hecho que este año 2014 sea aún más especial.*

## Índice

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>8</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>14</b>
1. Los tejidos articulares.....	15
1.1. El cartílago articular.....	16
1.2. El hueso subcondral.....	19
1.3. La membrana sinovial.....	22
2. La artrosis.....	25
2.1. Alteraciones tisulares en la OA.....	26
2.2. Mediadores de la patogénesis de la artrosis.....	29
3. Factores de riesgo asociados a la artrosis.....	32
3.1. Menopausia, déficit estrogénico y artrosis.....	32
3.2. Síndrome metabólico, obesidad y artrosis.....	34
4. Tratamiento farmacológico de la artrosis.....	38
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
1. Pacientes.....	45
2. Modelo animal.....	45
3. Estudios histológicos.....	47

---

3.1. Procesado de las muestras.....	47
3.2. Valoración de la sinovitis.....	47
3.3. Estudios de inmunohistoquímica.....	47
4. Cultivos celulares.....	48
4.1. Mantenimiento y diferenciación de la línea celular ATDC5.....	48
4.2. Mantenimiento y diferenciación de la línea celular MC3T3-E1.....	49
4.3. Aislamiento y cultivo primario de condrocitos humanos.....	49
4.4. Aislamiento y cultivo primario de osteoblastos humanos.....	50
5. Transfección celular.....	50
6. Aislamiento y caracterización de derivados del jengibre.....	51
7. Obtención de medios condicionados.....	51
8. Estudio de la viabilidad celular.....	51
9. Cuantificación de nitritos.....	52
10. ELISA.....	53
11. Estudio de la mineralización.....	53
12. Aislamiento del ARN.....	53
13. Estudios de expresión génica.....	54
13.1. Retrotranscripción.....	54
13.2. PCR a tiempo real.....	54
13.3. Cuantificación relativa.....	57
14. Aislamiento de proteínas.....	58

---

15. Estudios de expresión proteica.....	58
16. Estudios de actividad de catepsina K.....	59
17. Zimografía.....	60
18. Análisis estadístico.....	60
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
1. Estudio de la síntesis local de estrógenos en el cartílago.....	62
1.1. Los condrocitos humanos expresan una aromatasa funcional en cultivo	62
1.2. La expresión de aromatasa en condrocitos humanos es inducida durante el cultivo.....	63
1.3. La expresión de aromatasa acompaña a la pérdida de diferenciación condrocitaria.....	66
2. Estudio del papel de la LCN2 en el metabolismo de osteoblastos.....	68
2.1. Regulación de la expresión de la LCN2 durante la diferenciación osteoblástica.....	68
2.2. La LCN2 es regulada por factores inflamatorios en los osteoblastos de ratón.....	71
2.3. El aumento de la LCN2 incrementa la citotoxicidad del hierro y la actividad MMP-9 en los osteoblastos.....	73
2.4. La expresión de la LCN2 es regulada en los osteoblastos humanos por factores inflamatorios, catabólicos y anabólicos.....	75
2.5. Regulación de la expresión de la LCN2 en la relación entre los osteoblastos y los condrocitos.....	78
2.6. Regulación por factores anabólicos de la expresión de la LCN2 en los	

condrocitos.....	79
3. Estudio del efecto del tratamiento con la PTH[1-34] sobre la inflamación sinovial asociada a la OA.....	81
3.1. La PTH[1-34] reduce el grado de sinovitis en conejos con OA agravada por OP.....	81
3.2. El tratamiento con PTH[1-34] reduce la expresión de moléculas pro-inflamatorias y catabólicas.....	81
3.3. La PTH[1-34] reduce la fibrosis sinovial asociada a la OA.....	83
4. Estudio del efecto de derivados del jengibre sobre procesos tanto catabólicos como inflamatorios en los condrocitos.....	85
4.1. El 6-S inhibe la respuesta inflamatoria mediada por la vía de señalización del TLR4 en las células ATDC5.....	85
4.2. El 6-S es un inhibidor de la actividad MMP en las células ATDC5.....	88
4.3. El 6-S tiene actividad anti-inflamatoria y anti-catabólica en los condrocitos primarios humanos.....	89
4.4. La actividad anti-inflamatoria es independiente de la actividad anti-catepsina K en los compuestos derivados del jengibre.....	89
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>93</b>
1. Estudio de la síntesis local de estrógenos en el cartílago.....	95
2. Estudio del papel de la LCN2 en el metabolismo de los osteoblastos.....	100
3. Estudio del efecto del tratamiento con la PTH[1-34] sobre la inflamación sinovial asociada a la OA.....	108
4. Estudio del efecto de derivados del jengibre sobre procesos tanto catabólicos como inflamatorios en los condrocitos.....	112

<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>115</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>117</b>
<b>VIII. APORTACIONES CIENTÍFICAS.....</b>	<b>142</b>



## **Índice de figuras**

Figura 1.....	15
Figura 2.....	17
Figura 3.....	18
Figura 4.....	22
Figura 5.....	24
Figura 6.....	26
Figura 7.....	33
Figura 8.....	36
Figura 9.....	46
Figura 10.....	63
Figura 11.....	64
Figura 12.....	65
Figura 13.....	67
Figura 14.....	69
Figura 15.....	70
Figura 16.....	71
Figura 17.....	72
Figura 18.....	74
Figura 19.....	76

Figura 20.....	77
Figura 21.....	78
Figura 22.....	80
Figura 23.....	82
Figura 24.....	83
Figura 25.....	84
Figura 26.....	86
Figura 27.....	87
Figura 28.....	88
Figura 29.....	90
Figura 30.....	91
Figura 31.....	92
Figura 32.....	106

## Listado de abreviaturas

6-S	6-shogaol
ADAMTS	Disintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospodina, <i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AINÉ	Anti-inflamatorio no esteroideo
alfa-MEM	Medio esencial mínimo de Eagle con modificaciones alfa
ApoA1	Apolipoproteína A1
AR	Artritis reumatoide
ARN	Ácido ribonucleico
BCA	Ácido bicinconínico
COL1	Colágeno de tipo 1
COL10	Colágeno de tipo 10
COL11	Colágeno de tipo 11
COL2	Colágeno de tipo 2
COL3	Colágeno de tipo 3
COL9	Colágeno de tipo 9
COX2	Ciclooxigenasa 2
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño tisular, <i>damage-associated molecular patterns</i>
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DMEM	Modificación de Dulbecco del medio esencial mínimo de Eagle
DMOAD	Fármacos modificadores de la enfermedad artrósica, <i>disease-modifying OA drugs</i>
Dx	Dexametasona

EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ER	Receptor de estrógenos, estrogen receptor
ERK1/2	Quinasa regulada por señales extracelulares, <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FA	Fosfatasa alcalina
FBS	Suero fetal bovino, <i>fetal bovine serum</i>
FS	Fibroblastos sinoviales
GAG	Glicosaminoglicanos
HDL	Lipoproteína de alta densidad, <i>high density lipoprotein</i>
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico 1, <i>insulin-like growth factor 1</i>
IL	Interleucina
LCN2	Lipocalina 2
LDL	Lipoproteína de baja densidad, <i>low density lipoprotein</i>
LDLox	LDL oxidada
LOX-1	Receptor 1 de LDLox de tipo leptina, <i>leptin-type oxidized LDL receptor 1</i>
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
LXR	Receptor X hepático, <i>liver X receptor</i>
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos, <i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
MCSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos, <i>macrophage colony stimulating factor</i>
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteasa de matriz
MPH	Metilprednisolona

MTT	3(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NGAL	Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos, <i>neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
NOS2	Sintetasa de óxido nítrico 2, <i>nitric oxide synthase 2</i>
OA	Artrosis, osteoarthritis
OB	Osteoblasto
OC	Osteoclasto
OP	Osteoporosis
OPOA	Artrosis agravada por osteoporosis
OVX	Ovariectomía
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos, <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	Tampón fosfato salino, <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, <i>polimerase chain reaction</i>
PGE2	Prostaglandina E2
PTH	Hormona paratiroidea
PVDF	Fluoruro de polivinilideno, <i>polyvinylidene difluoride</i>
RANK	Receptor activador para el factor nuclear $\kappa B$ , <i>receptor activator for nuclear factor <math>\kappa B</math></i>
RANKL	Ligando de RANK
RT	Retrotranscripción
SDS	Dodecilsulfato sódico, <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SERM	Modulador selectivo de receptores de estrógenos, <i>selective estrogen receptor modulator</i>
SMet	Síndrome metabólico

SYSADOA	Fármacos de acción lenta modificador de los síntomas de la OA, <i>symptomatic slow-acting drug for osteoarthritis</i>
TBS-T	Tampón Tris salino, <i>Tris buffered saline</i>
TGF $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$ , <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TLR	Receptor de tipo toll, <i>toll-like receptor</i>
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$ , <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
TRAP	Fosfatasa ácida resistente al tartrato, <i>tartrate-resistant acid phosphatase</i>

## **RESUMEN**

## **Oportunidades terapéuticas más allá del cartílago en la artrosis de rodilla: una perspectiva fisiopatológica**

### **INTRODUCCIÓN**

La artrosis (OA) es la enfermedad articular más común y una de las principales causas de dolor e incapacidad física en personas de avanzada edad. Pese a su elevada prevalencia, la OA sigue siendo una enfermedad cuya etiopatogenia no es bien conocida, y para la cual no existen estrategias terapéuticas eficaces puesto que los tratamientos existentes están dirigidos a controlar los síntomas de la enfermedad, en lugar de modificar su curso natural.

La OA se caracteriza por una degeneración progresiva del cartílago articular. Sin embargo, otros tejidos de la articulación como son el hueso subcondral, la membrana sinovial, los meniscos y los ligamentos también se ven afectados. En relación al hueso subcondral, la OA incrementa el remodelado óseo, asociado a un mayor deterioro del cartílago. La sinovitis está presente en el 50% de los pacientes con OA sintomática y, aunque de menor intensidad que la observada en las artritis crónicas, causa dolor, limitación de la función articular y contribuye a la degradación del cartílago. Por todo lo cual, el estudio de la OA debe tener en cuenta a todos los tejidos articulares, no solo en la investigación de sus mecanismos patogénicos, sino también desde la perspectiva terapéutica.

La OA se asocia a diferentes factores de riesgo como son la edad, el sexo, el estado hormonal, las variaciones de la densidad mineral ósea, la obesidad, las alteraciones biomecánicas y la predisposición genética. De esta forma, estos factores son objeto de estudio en la prevención y el control de la progresión de la enfermedad. Entre ellos, la obesidad y la deficiencia estrogénica, con una elevada prevalencia en esta enfermedad, son de especial relieve.

La alta prevalencia de la OA en mujeres menopáusicas ha sido relacionada con el cese del efecto protector de los estrógenos sobre el cartílago articular. Sin embargo, durante la menopausia, diversos tejidos extragonadales son capaces de producir estrógenos de forma local. La aromatasas es la enzima principal en este sistema, sintetizando estradiol y estrona a partir de testosterona y androstenediona, respectivamente. A pesar de la



trascendencia que este sistema puede tener para mantener la homeostasis del cartílago durante la menopausia, existen pocos estudios en cartílago humano que profundicen en la relación entre aromatasa y desarrollo de la OA.

Por su parte, la obesidad clásicamente se ha asociado a sobrecarga articular y estrés mecánico, con inducción de genes mecanosensibles en el cartílago y el hueso subcondral que facilitarían el deterioro de estos tejidos. El descubrimiento posterior de que la obesidad también es un factor de riesgo en la OA de las articulaciones sin carga, como las de la mano, ha planteado la posible participación de un componente metabólico en su patogenia. Las adipocinas son importantes mediadores de las alteraciones sistémicas relacionadas con la obesidad. Entre estas moléculas se encuentra la lipocalina 2 (LCN2), recientemente relacionada con la degradación del cartílago en la OA. A pesar de ser un importante gen mecanosensible en osteoblastos, el comportamiento de la LCN2 no ha sido analizado previamente en la unión osteocondral en una enfermedad biomecánica como es la OA.

Es importante destacar que todas las aproximaciones terapéuticas existentes son tratamientos sintomáticos, cuya finalidad es únicamente paliar el dolor y, como consecuencia, mejorar la función. Actualmente, está emergiendo una nueva estrategia cuya finalidad es combinar fármacos con capacidad para inhibir varios mecanismos patogénicos, dianas terapéuticas o vías de señalización intracelular al mismo tiempo. Siguiendo esta estrategia, sería interesante desarrollar moléculas con efectos duales, evitando la necesidad de utilizar combinaciones de medicamentos. En este sentido, la capacidad de la PTH[1-34] para frenar la progresión del daño al cartílago, a la vez que mejora la estructura ósea, ha sido previamente descrita. A su vez, diversos productos naturales, entre ellos el jengibre, que han sido utilizados como agentes anti-reumáticos en la medicina tradicional china, podrían tener un efecto anti-inflamatorio y anti-catabólico en el cartílago OA.

Por tanto, la complejidad de la OA sugiere la necesidad de un nuevo enfoque terapéutico que requiere la investigación de fármacos con potencial efecto sobre múltiples aspectos de la enfermedad, así como el estudio de productos naturales que podrían ser prometedores principios activos para el tratamiento de la OA.

## **OBJETIVOS**

Basándonos en los principales factores relacionados con la OA, en esta tesis hemos

investigado los factores etio-patogénicos que hemos considerado más relevantes y factibles de ser modulados farmacológicamente.

Desde otra perspectiva diferente, nos hemos preguntado si fármacos con una diana tisular articular bien definida, podrían actuar en otros tejidos articulares. La posibilidad de que algunos de estos fármacos puedan actuar en varias de las estructuras anatómicas que conforman la articulación y que, por supuesto, participan en la patogenia de la enfermedad, constituiría otra forma novedosa de plantear una estrategia terapéutica en la OA, basada en la individualización de tratamientos.

Por tanto, los objetivos de esta tesis se agrupan en dos grandes apartados:

A) En primer lugar, se han analizado vías fisiopatogénicas relevantes en la OA, con la finalidad de buscar nuevos abordajes terapéuticos de esta enfermedad. De esta forma, se establecieron los siguientes subobjetivos:

1. Estudiar la síntesis local de estrógenos en condrocitos cultivados y en el cartílago articular humano a través de la enzima aromatasa, y su posible relevancia fisiológica como mecanismo protector frente al desarrollo de la OA durante la deficiencia estrogénica que tiene lugar en las mujeres menopáusicas.
2. Determinar el efecto de la lipocalina-2, una adipocina con propiedades catabólicas, sobre la fisiología del hueso y su posible papel en la relación hueso-cartílago en el contexto de una aproximación *in vitro* a la artrosis.

B) Por otro lado, se han estudiado dos compuestos distintos, ambos con potencial efecto anti-OA, desde una perspectiva patogénica de la enfermedad, buscando detectar su acción en otros tejidos articulares, con dos subobjetivos:

3. Evaluar el efecto de la administración intermitente de la PTH[1-34] en la sinovitis de un modelo animal de OA agravada por osteoporosis en el que nuestro grupo ya ha descrito previamente su papel beneficioso sobre el cartílago y el hueso subcondral.
4. Analizar las propiedades de un principio activo natural derivado del jengibre sobre condrocitos artrósicos humanos, ya que potencialmente podría ser un tratamiento anti-inflamatorio y anti-catabólico en el cartílago artrósico pero también un agente

anti-resortivo en el hueso.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En relación al primer objetivo de esta tesis, hemos encontrado que el cartílago articular no es capaz de expresar la enzima aromatasa, y por tanto de sintetizar estrógenos a nivel local, de manera relevante durante la menopausia tanto en pacientes sanos como con OA. Además, el proceso de cultivo de los condrocitos modifica de forma sustancial el metabolismo estrogénico de estas células, induciendo la expresión de esta enzima independientemente de la privación estrogénica y asociado con el proceso de desdiferenciación que ocurre durante el cultivo en monocapa de los condrocitos. Por tanto, estos resultados, junto con el hecho de que el cartílago humano expresa los receptores de estrógenos, sugiere que el cartílago articular podría actuar meramente como un receptor de estas hormonas. De esta forma, la modulación del metabolismo estrogénico en este tejido sería efectiva mediante el uso de moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM) o terapia sustitutiva con estrógenos, pero no con fármacos reguladores de la actividad de la aromatasa. Además, la inducción de la aromatasa durante el cultivo no fue revertida tras la rediferenciación en cultivo en 3D, indicando que estas aproximaciones no son capaces de recuperar el fenotipo de los condrocitos completamente, permaneciendo alteraciones al menos en el metabolismo de los estrógenos.

Por otro lado, hemos estudiado la modulación de la LCN2 en la diferenciación de los osteoblastos. Hemos encontrado que su expresión disminuye durante este proceso, y esta adipokina presenta efectos catabólicos para estas células. Además, observamos una inducción de la expresión en los osteoblastos en presencia de factores pro-inflamatorios y catabólicos, mientras que factores anabólicos como el TGF $\beta$  y el IGF-1, que están incrementados en situaciones de sobrecarga mecánica e inducen esclerosis subcondral en la OA, fueron capaces de reducir esta estimulación de la expresión de la LCN2. Por otro lado, la LCN2 podría promover los procesos catabólicos en el cartílago al ser inducida por el hueso subcondral alterado y por factores pro-inflamatorios producidos por otros tejidos articulares. Así, la LCN2 podría ser un mediador relevante en la comunicación osteocondral durante el desarrollo de la OA.

En el caso de la PTH[1-34], ha sido descrito previamente que su administración intermitente mejora la estructura y densidad del hueso por aumento de la formación ósea,

con un menor daño en el cartílago OA. Por tanto, decidimos estudiar si esta molécula actuaba también sobre la inflamación sinovial característica de la OA. En este trabajo, observamos que la administración intermitente de la PTH[1-34] presentaba un efecto beneficioso sobre la sinovitis crónica en un modelo de conejo de OA agravada por osteoporosis, reduciendo el componente inflamatorio, catabólico y fibrótico de la membrana sinovial de estos animales. Estos resultados muestran que, además de mejorar la estructura del cartílago y del hueso, este tratamiento es capaz de reducir la sinovitis crónica presente en la OA. Por tanto, la utilización de la PTH[1-34] de forma intermitente podría ser una interesante aproximación para el tratamiento de la OA que actuaría sobre el daño a los tres principales tejidos implicados en la enfermedad.

El jengibre es utilizado por la medicina tradicional china para tratar diversas patologías, incluyendo la OA. Diferentes trabajos científicos han confirmado la capacidad de los derivados del jengibre para controlar respuestas inmunes innatas. De entre estos derivados, el 6-shogaol es el compuesto más activo del jengibre. Por ello, estudiamos las propiedades anti-inflamatorias y anti-catabólicas del 6-shogaol en presencia de estímulos pro-inflamatorios en condrocitos. Así, encontramos que el 6-shogaol presenta efectos anti-inflamatorios, por bloqueo de la señalización del TLR4, así como anti-catabólicos, por inhibición de la actividad de las enzimas metaloproteasas de matriz (MMPs) y cathepsina K, en condrocitos humanos y de ratón. Puesto que ha sido descrito que se pueden alcanzar dosis terapéuticas y no tóxicas de derivados del jengibre en suero tras la administración oral de este compuesto, estos resultados convierten al 6-shogaol en un potencial agente terapéutico para reducir la degradación del cartílago en la OA. Además, teniendo en cuenta el papel de las MMPs y la cathepsina K en el remodelado óseo, este compuesto podría tener efectos duales, actuando sobre el daño en el cartílago pero también el elevado remodelado subcondral que ocurre durante la OA.

## **CONCLUSIONES**

Esta tesis profundiza en el conocimiento sobre vías fisiopatogénicas implicadas en la evolución de la OA como son el déficit estrogénico y las consecuencias metabólicas y biomecánicas de la obesidad. Además, aporta nuevos efectos terapéuticos de la PTH[1-34] y del 6-shogaol, que podrían actuar sobre varios de los tejidos articulares que contribuyen a esta patología. De esta forma, las conclusiones de esta tesis son las siguientes:

1. El cartílago articular de mujeres menopáusicas no expresa cantidades significativas de la enzima aromatasa, siendo por tanto incapaz de producir estrógenos de forma local. Este resultado sugiere que la modulación farmacológica de la enzima aromatasa no afecta de manera directa al metabolismo del cartílago.
2. El cultivo de los condrocitos en monocapa conlleva alteraciones en el metabolismo estrogénico por inducción de la expresión de la enzima aromatasa que podrían ser irreversibles. Estrategias terapéuticas que requieran una expansión celular previa en cultivo en monocapa, como el trasplante de condrocitos, deberán tener en consideración estas aberraciones metabólicas.
3. La expresión de la adipoquina LCN2 se ve drásticamente reducida durante las etapas iniciales de la diferenciación osteoblástica, y es regulada por factores anabólicos (TGF $\beta$  e IGF-1) y catabólicos (IL-1 $\beta$ , LPS y glucocorticoides) en los osteoblastos.
4. La LCN2 podría ser un mediador relevante en la relación osteocondral durante el desarrollo de la OA. Esta adipoquina presenta efectos deletéreos para los osteoblastos y favorece procesos catabólicos en el cartílago mediante su inducción por el hueso subcondral alterado. A pesar de que los factores anabólicos TGF $\beta$  e IGF-1 muestran un efecto beneficioso sobre la expresión de la LCN2 en el cartílago, la alteración de la señalización de estos factores de crecimiento podría perpetuar los fenómenos catabólicos en el cartílago articular mediados por la LCN2 durante la OA.
5. La administración intermitente de la PTH[1-34] podría ser un tratamiento prometedor para pacientes que presenten OA asociada a sinovitis crónica. Además de su efecto beneficioso sobre la estructura ósea y del cartílago, la PTH[1-34] podría mejorar los síntomas y reducir la evolución de la enfermedad al actuar sobre el componente inflamatorio, catabólico y fibrótico de la membrana sinovial.
6. El 6-S presenta propiedades anti-inflamatorias, por bloqueo de la señalización del TLR4, así como anti-catabólicas, por reducción de la actividad de las MMPs y la cathepsina K, en los condrocitos. Esto le convierte en un potencial agente terapéutico para detener tanto la degradación del cartílago como el elevado remodelado óseo en el hueso subcondral que ocurre durante la OA.

## **ABSTRACT**

## **Therapeutic opportunities beyond the cartilage in knee osteoarthritis: a pathophysiological perspective**

### **INTRODUCTION**

Osteoarthritis (OA) is the most common joint disease and one of the main causes of pain and disability in the elderly. Despite its high prevalence, the aetiology of OA remains poorly understood, precluding the development of effective management. Current therapeutic strategies focus on symptom relief rather than altering disease progression.

OA is characterized by progressive degeneration of articular cartilage; however, a range of articular tissues are also involved, including the subchondral bone, synovial membrane, menisci and supporting ligaments. In regards to subchondral bone, OA is characterized by increased bone remodelling, which has been associated with worsened cartilage degeneration. Synovitis is another prominent feature of OA, present in 50% of patients with symptomatic OA. Although synovial inflammation in OA is lower than in rheumatoid arthritis, it aggravates cartilage damage, increasing joint pain and functional morbidity. Given the multi-factorial development of OA, investigation of this disease requires evaluation of multiple articular tissues. This will allow a better understanding of the aetiology of this complex disease and aid the development of therapeutic strategies which target a broader range of pathological events.

OA has been associated with a range of aetiological factors, such as age, sex, hormonal status, bone mineral density, obesity, and biomechanical and genetic predispositions. These factors present potential avenues for the development of therapies that may prevent or even reverse the disease progression. Obesity and oestrogen deficiency appear to have particularly important relationships with OA, with a high prevalence of the disease in these populations.

The high prevalence of OA in menopausal women has been linked to the cessation of oestrogens protective role in articular cartilage. However, during menopause, several extra-gonadal tissues are able to produce oestrogens locally. Aromatase is the main enzyme involved in this system, synthesizing oestradiol and oestrone from testosterone and androstenedione, respectively. Despite the possible relevance of this mechanism within menopausal cartilage, the topic is poorly studied in human cartilage and deserves further

attention to determine the potential role of aromatase in slowing the development of OA.

Regarding the effect of obesity in OA, it has been associated with articular overload and mechanical stress, inducing mechanosensitive genes in both cartilage and subchondral bone. However, the relationship between obesity and OA in non-weight-bearing joints such as those in the hand has increased our understanding of the metabolic effects of obesity in the development of OA. Adipokines have emerged as important mediators of such obesity-related systemic alterations. Among these molecules, lipocalin 2 (LCN2) is a novel adipokine which has been related to cartilage damage during OA. Despite being an important mechanoresponsive gene in osteoblasts, the role of this adipokine at the osteochondral junction in the context of OA has not been previously studied.

### **AIMS**

Based on the main factors related to OA, in this thesis we have investigated, from a pathophysiological approach, potential therapeutic targets that could slow, or even reverse, the progression of the disease. To accomplish this, we investigated two primary aetiological factors: oestrogen deficiency, and the metabolic and mechanical consequences of obesity.

In addition, we determined whether compounds with potential effects on various articular tissues could be effective therapies for OA. These findings could lead to the development of novel therapeutic agents that treat a wider range of articular tissues involved in the progression of OA. With this objective, we studied two compounds: PTH[1-34], currently used for the treatment of osteoporosis, and 6-shogaol, the component of ginger with the greatest anti-inflammatory activity.

Therefore, we established the following aims:

1. To study local aromatase-derived oestrogen biosynthesis in cultured chondrocytes and human articular cartilage, and the potential physiological relevance of this system as a protective mechanism in menopausal OA.
2. To determine the role of LCN2 in normal bone physiology and its potential role in bone-cartilage crosstalk from the perspective of an *in vitro* approach to OA.
3. To evaluate the effect of PTH[1-34] on synovitis in an animal model of OA



exacerbated by osteoporosis where our group has previously described a beneficial role in cartilage and subchondral bone for this molecule.

4. To analyse the properties of a natural ginger-derived compound on both murine and human OA chondrocytes, which may exert anti-inflammatory and anti-catabolic effects on OA cartilage as well as represent an anti-resorptive agent for bone.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

Regarding the first objective of this thesis, we found that human articular cartilage is not able to express the aromatase enzyme, and is therefore unable to locally synthesize oestrogen during menopause, in both healthy and osteoarthritic patients. Furthermore, chondrocyte culture significantly modifies oestrogenic metabolism in these cells, inducing the expression of aromatase, independent of oestrogen deprivation. Furthermore, aromatase expression was associated with the de-differentiation process that normally occurs during chondrocyte monolayer culture. These results, together with the fact that human cartilage expresses oestrogen receptors, suggest that articular cartilage might merely act as a receptor of these hormones. Therefore, the modulation of oestrogen metabolism in this tissue would be affected by the use of selective oestrogen receptor modulators (SERM) or oestrogen replacement therapy, but not by drugs targeting aromatase activity. In addition, aromatase induction during culture was not reversed by re-differentiation in 3D culture, indicating that these approaches are not able to fully recover the chondrocyte phenotype, with persistent alterations in oestrogen metabolism.

We also studied the modulation of LCN2 in osteoblast differentiation. We have found that its expression is decreased during this process and it mediates catabolic effects in osteoblasts. However, we observed elevated LCN2 expression in osteoblasts in the presence of pro-inflammatory and catabolic factors, whereas anabolic factors such as TGF $\beta$  and IGF-1, which are increased by mechanical overload and induce subchondral bone sclerosis in OA, were capable of reducing the stimulation of LCN2 expression. In addition, LCN2 may promote catabolic processes in cartilage after induction by altered subchondral bone and the pro-inflammatory factors produced by surrounding joint tissues during OA. Therefore, this adipokine may be an important mediator in osteochondral crosstalk during the development of OA.

In regards to PTH[1-34], intermittent administration reduces cartilage damage in OA by improving bone structure and mass via increased bone formation. Therefore, we studied whether this molecule also affects the synovial inflammation characteristic of OA. We observed that intermittent administration of PTH[1-34] has beneficial effects on chronic synovitis in a rabbit model of OA exacerbated by osteoporosis. Specifically, we found reduced inflammatory, catabolic and fibrotic components in the synovium after PTH[1-34] therapy. These results indicate that, in addition to its beneficial effects on cartilage and bone, this treatment is able to ameliorate synovial inflammation in OA. This capacity for a broader spectrum of action within the joint, suggests that intermittent PTH[1-34] may be an effective and multifaceted treatment for OA.

Ginger has long been used in traditional Chinese medicine to treat several pathologies, including OA. After entering the realm of mainstream medicine, scientific research has confirmed the ability of ginger derivatives to control innate immune responses. Among these derivatives, 6-shogaol has been identified as the most active compound present in ginger. We studied the anti-inflammatory and anti-catabolic properties of 6-shogaol in the presence of pro-inflammatory stimuli in chondrocytes. We observed that 6-shogaol has anti-inflammatory properties, by blocking TLR4 signalling, and anti-catabolic effects, by inhibiting the activity of the degradative enzymes matrix metalloproteinases (MMPs) and cathepsin K in both human and murine chondrocytes. As therapeutic non-toxic serum concentrations of ginger derivatives can be attained via oral administration, these results make 6-shogaol a potential therapy for reducing cartilage degradation in OA. In addition, given the role of MMPs and cathepsin K in bone remodelling, this compound may exert dual effects, targeting cartilage damage as well as the high subchondral bone turnover that occurs in OA.

## **CONCLUSIONS**

This thesis has increased our understanding of the pathophysiological pathways involved in the development of OA with focus on the effects of oestrogen deficiency and the metabolic and biomechanical consequences of obesity. We have also described novel therapeutic effects of PTH[1-34] and 6-shogaol, which may act on multiple intra-articular tissues which contribute to this condition. The conclusions of this thesis are as follows:

1. Articular cartilage from menopausal women does not express a significant amount of the enzyme aromatase and is unable to locally produce oestrogens. This result suggests that pharmacological modulation of aromatase does not directly affect cartilage metabolism.
2. Chondrocyte monolayer culture alters oestrogen metabolism by inducing aromatase expression, which may be irreversible. Therapeutic strategies requiring prior cellular expansion with monolayer culture, such as chondrocyte transplantation, should take into account these metabolic aberrations.
3. The expression of the adipokine LCN2 is drastically reduced during the initial stages of osteoblast differentiation, and can be regulated by both anabolic (TGF $\beta$  and IGF-1) and catabolic factors (IL-1 $\beta$ , LPS and glucocorticoids) in osteoblasts.
4. LCN2 may be an important mediator at the osteochondral junction during the development of OA. LCN2 has deleterious effects on osteoblasts and up-regulates catabolic processes within cartilage due to its induced expression in this tissue by altered subchondral bone. Despite the fact that the anabolic factors TGF $\beta$  and IGF-1 show a beneficial effect on LCN2 expression in cartilage, aberrant signalling by these growth factors could perpetuate LCN2-mediated catabolic processes in articular cartilage during OA.
5. Intermittent administration of PTH[1-34] could be a promising treatment for patients with OA associated with chronic synovitis. Aside from its beneficial role in cartilage and bone structure, PTH[1-34] may improve symptoms and reduce the progression of OA by acting on the inflammatory, catabolic and fibrotic components of the synovial membrane.
6. 6-shogaol exerts anti-inflammatory effects via blockade of TLR4 signalling, and anti-catabolic effects by reducing MMP and cathepsin K activity in chondrocytes. As a result, this compound may represent a potential therapeutic agent to reduce both cartilage degradation and the increased subchondral bone remodelling that occurs during OA.

# **I. INTRODUCCIÓN**

## 1. Los tejidos articulares

Una articulación es “la unión entre huesos u órganos esqueléticos”, mediante distintas estructuras estabilizantes. Éstas, según sus características, permitirán o no el movimiento de la articulación, clasificándose así en tres grupos:

- Sinartrosis o fibrosas: articulaciones sin movilidad donde los huesos están unidos entre sí por tejido fibroso.
- Anfiartrosis o cartilaginosas: articulaciones unidas por un cartílago que limita la movilidad entre las dos superficies articulares.
- Diartrosis o sinoviales: articulaciones dotadas de movilidad en las que entre los cuerpos articulares se sitúa una cavidad articular que impide la unión directa entre los huesos que se articulan.

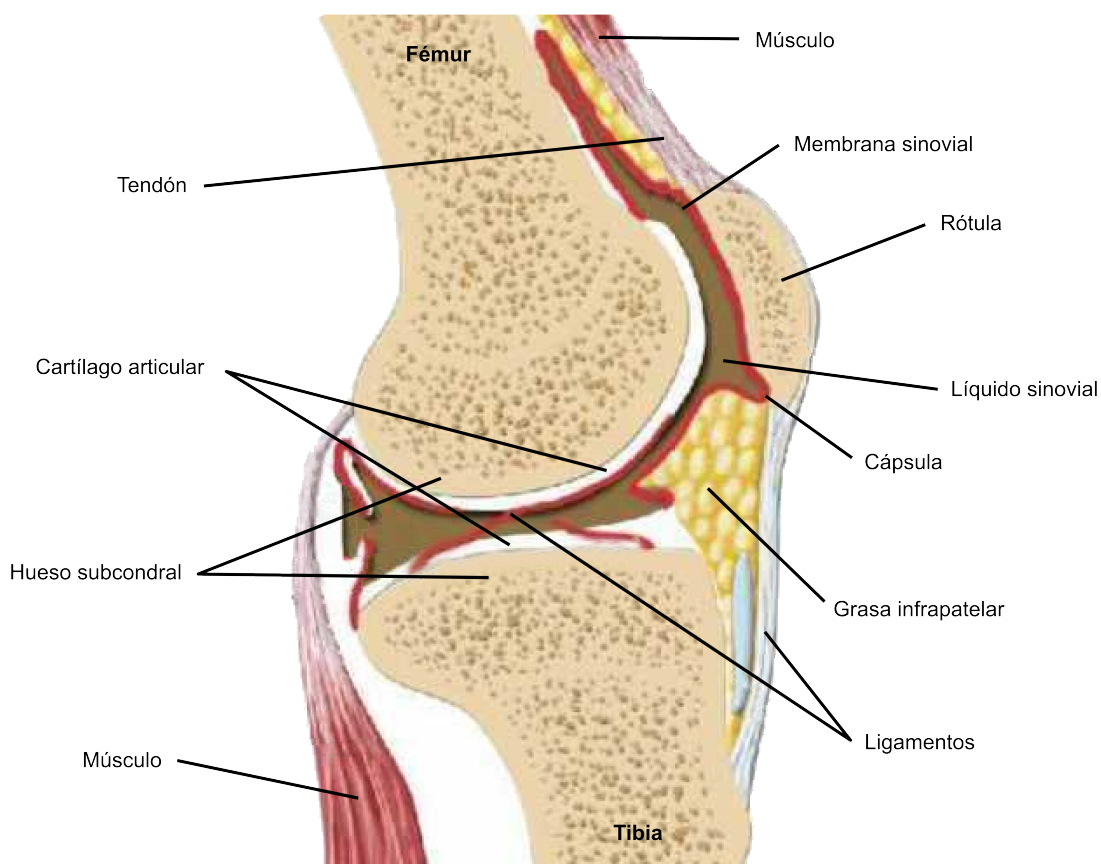


Figura 1. Representación esquemática de las principales estructuras de una articulación sinovial.

La articulación sinovial permite un amplio espectro de movimientos. Diversas estructuras, incluyendo músculos, tendones, ligamentos, cápsula, membrana sinovial, cartílago, hueso y tejido adiposo, contribuyen a la estabilidad y funcionamiento de este tipo de articulaciones (Figura 1). De todos estos componentes, el cartílago articular, el hueso y la membrana sinovial son los principales elementos en la fisiología y fisiopatología articular.

### **1.1. El cartílago articular**

Dependiendo de su composición, existen tres tipos de cartílago con diferentes propiedades:

- Cartílago hialino, compuesto principalmente de colágeno de tipo II, glicosaminoglicanos (GAG), proteoglicanos y glicoproteínas adhesivas. Es el cartílago más abundante, estando presente en el esqueleto fetal y manteniéndose en el adulto en el tracto respiratorio superior, en las costillas y en la superficie de las articulaciones móviles principalmente.
- Cartílago elástico, caracterizado por presentar fibras elásticas además de los componentes del cartílago hialino. Se encuentra en el oído externo, en el conducto auditivo externo, la trompa de Eustaquio y la epiglotis.
- Cartílago fibroso, que presenta gran cantidad de colágeno de tipo I junto con otras moléculas que aparecen en el cartílago hialino. Está presente en los discos intervertebrales, la sínfisis púbica, los meniscos y la unión de los tendones a los huesos, entre otras localizaciones.

Las superficies de contacto de las articulaciones están cubiertas con un cartílago hialino especializado denominado cartílago articular. En circunstancias normales, este cartílago disminuye la fricción entre las superficies de contacto gracias a su resistencia a la compresión y al desgaste, permitiendo la rapidez de movimientos y contribuyendo a la estabilidad articular [157]. En el cartílago articular existe un único tipo celular: el condrocito. En función de la distribución de estas células y la composición de la matriz cartilaginosa en la que está inmerso, se pueden distinguir cuatro capas en el cartílago [86] (Figura 2):

- Zona superficial o tangencial: los condrocitos aparecen aplanados y las fibras de colágeno se sitúan paralelas a la superficie.
- Zona de transición o intermedia: los condrocitos aparecen agrupados en condronas y las fibras de colágeno presentan una organización intermedia.
- Zona profunda o radial: las fibras de colágeno se sitúan de forma perpendicular a la superficie del cartílago.
- Zona calcificada: la matriz extracelular (MEC) aparece mineralizada, ocupando una zona entre el hueso subcondral y la *tidemark* o frente de calcificación.

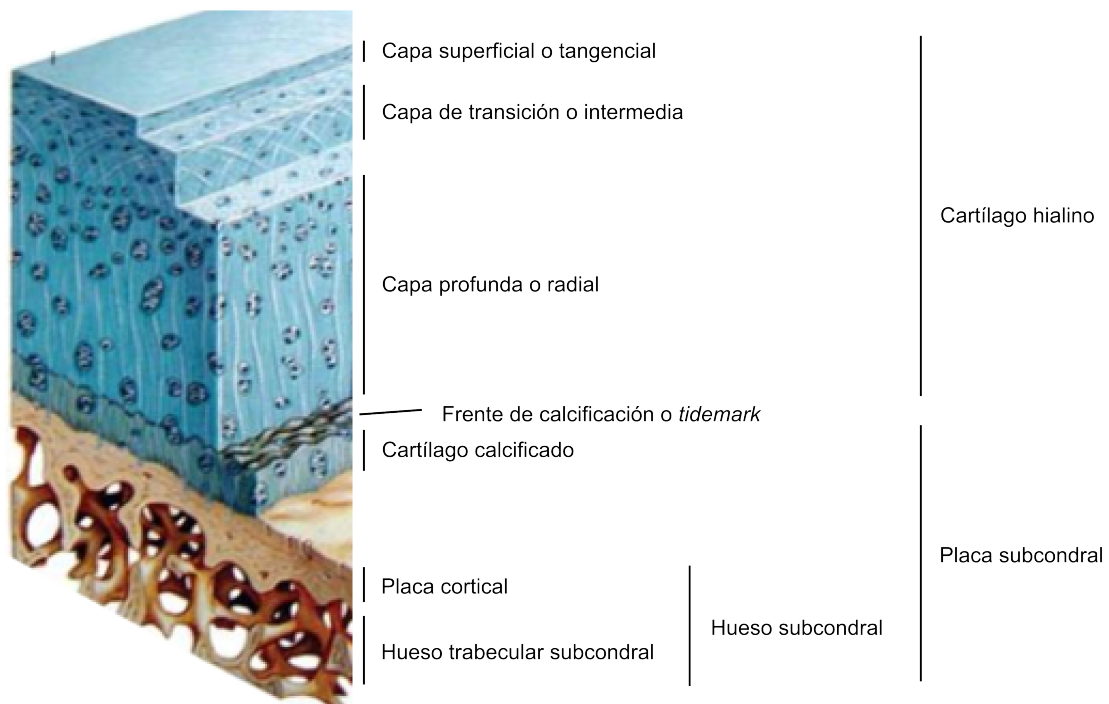


Figura 2. Estructura del cartílago articular y el hueso subcondral.

Los condrocitos suponen sólo entre 2 y 5% del volumen del tejido, y se encuentran embebidos en una MEC avascular. Esta matriz está compuesta por 10%–30% de colágeno (principalmente colágeno de tipo II) y 3%–10% de proteoglicanos (esencialmente unidades de agrecano asociadas por ácido hialurónico y unidas a condroitín-sulfato y queratán-sulfato) junto con otras glicoproteínas y lípidos. Los proteoglicanos proporcionan carga aniónica y aumentan la osmolaridad de esta matriz, creándose una red muy organizada con

poros que se encuentran rellenos de agua (aproximadamente entre el 60 y el 85% del peso total del tejido) (Figura 3). Así, la MEC junto con el lubricante que recubre las superficies articulares, permite que la articulación resista la carga y reduce la fricción durante el movimiento [49].

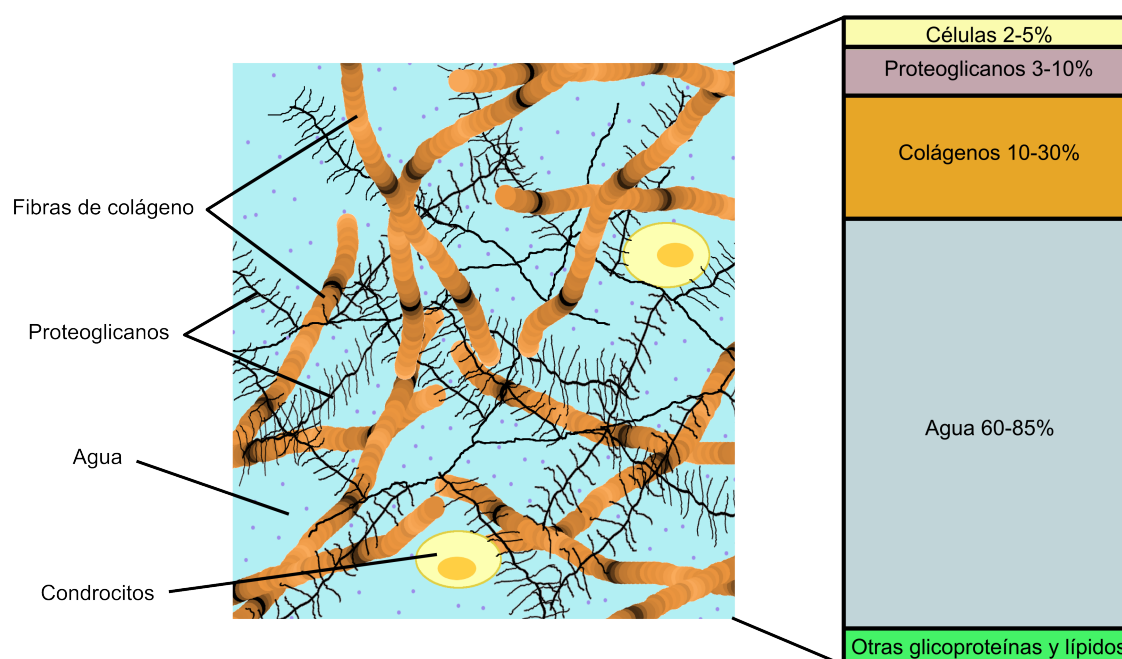


Figura 3. Estructura y composición de la matriz extracelular del cartílago hialino.

Sin embargo, debido a la ausencia de vasos sanguíneos en este tejido, la MEC también es responsable de la disponibilidad de nutrientes para los condrocitos. Para acceder a las células, las moléculas deben difundir por la MEC, siendo esta difusión dependiente de la carga y el tamaño. El movimiento articular supone la aparición de corrientes en el líquido sinovial y de cambios de carga cíclicos en la MEC que incrementan la difusión de moléculas, especialmente las de mayor tamaño, cuyo movimiento por la matriz está más restringido en reposo [211].

Puesto que es el único tipo celular del cartílago, el condrocito es responsable de la renovación y el mantenimiento de la MEC. En un cartílago normal, estas células se encuentran en un estado cuasi quiescente que permite mantener un bajo remodelado de la matriz encargado de la degradación de las moléculas deterioradas por la carga o la fatiga y su reemplazo por otras de nueva síntesis [124]. Por ello, los condrocitos de un cartílago



articular maduro sano producen mayoritariamente colágeno de tipo II (COL2) y agregano, los principales componentes de la MEC.

### **1.2. El hueso subcondral**

El hueso subcondral es aquél adyacente al cartílago calcificado, con el que forma la denominada placa subcondral. El hueso subcondral consta a su vez de dos capas con diferente estructura: la placa cortical, con un hueso compacto inmediatamente por debajo del cartílago, y el hueso trabecular subcondral [28, 34] (Figura 2). El hueso subcondral es un elemento fundamental para entender la mecánica articular, absorbiendo cargas intermitentes, a veces violentas, y al mismo tiempo proporcionando sostén y protección al cartílago articular. Todo lo cual se integra en una unidad funcional biomecánica, altamente compleja, que permite un correcto funcionamiento durante el reposo y el movimiento articular. Además, el hueso subcondral es fuente de nutrientes y otros factores para el cartílago, produciéndose un importante intercambio molecular entre ambos tejidos articulares [34, 211].

El hueso está compuesto por una MEC mineralizada que confiere la gran resistencia necesaria para su función como soporte mecánico. El componente mineral constituye cerca del 65% del peso del hueso, mientras que la parte orgánica sólo supone el 25%. Las moléculas mayoritarias en cada uno de estos componentes son los cristales de hidroxiapatita y el COL1, respectivamente. Sin embargo, la composición de la matriz mineral puede verse modificada por procesos fisiológicos y fisiopatológicos, así como por distintos fármacos que alteran el metabolismo óseo [86].

Aunque en la médula ósea existen numerosos tipos celulares como adipocitos, células inmunes y células progenitoras, las principales células del hueso relacionados con el metabolismo óseo son principalmente tres: los osteocitos, los osteoblastos (OB) y los osteoclastos (OC). Los osteocitos son células quiescentes embebidas en la matriz mineral del hueso que actúan como mecano-sensores y como productores de mediadores moleculares para regular el remodelado óseo. Estas células provienen de otro tipo celular óseo, los OB, que son las células formadoras de hueso que producen la matriz orgánica y colaboran en el proceso de mineralización. Una vez mineralizada la MEC, algunos OB quedan atrapados, dando lugar a los osteocitos. Finalmente, el tercer tipo celular

involucrado en el metabolismo óseo son los OC, encargados del proceso de resorción ósea con la capacidad de disolver el compuesto mineral de la matriz y de digerir la parte orgánica [24, 56, 86].

Los OB son células de origen mesenquimal cuya diferenciación se divide en tres fases: proliferación, maduración de la matriz extracelular y mineralización [118]. En las primeras etapas, las células sufren cambios morfológicos y producen principalmente COL1, con una síntesis máxima en los estadios más maduros en los que también producen fosfatasa alcalina (FA) que permitirá la mineralización de la MEC. Este estado está acompañado de la expresión de otras moléculas relacionadas con la formación ósea como son la osteopontina, la osteonectina, la sialoproteína ósea y la osteocalcina [93]. Es importante destacar que las células mesenquimales son también precursoras de otros linajes celulares, como es el caso de los adipocitos. El destino de las células mesenquimales está finamente regulado, siendo la diferenciación osteoblástica y adipocítica dos procesos excluyentes en los que las numerosas rutas de señalización involucradas tienen efectos opuestos en uno y otro caso [92]. Así, los adipocitos presentes en la médula ósea adquieren un importante papel también en el metabolismo óseo, ya que el tejido adiposo produce una gran cantidad de hormonas y citoquinas, como son los estrógenos y las adipoquinas, con capacidad para modular la diferenciación osteoblástica [140, 179].

Los OC, en cambio, son células multinucleadas originadas por la fusión de monocitos/macrófagos activados en presencia del factor estimulante de colonias de macrófagos (*Macrophage Colony Stimulating Factor*, MCSF) y el ligando del receptor activador para el factor nuclear  $\kappa B$  (*Receptor Activator for Nuclear Factor  $\kappa B$  Ligand*, RANKL). MCSF y RANKL son producidos por los OB, los osteocitos y las células del estroma. El primero induce supervivencia, proliferación y diferenciación de los precursores de OC, así como la inducción de la expresión de RANK, el receptor de RANKL. RANKL es el principal responsable de la fusión y diferenciación de los precursores a OC (osteoclastogénesis), así como de la actividad resorptiva. Durante el proceso de resorción, los OC se unen fuertemente a la superficie del hueso mediante un “borde en cepillo”, formando una laguna de resorción o laguna de Howship. La acidificación de este espacio mediante el bombeo de protones es indispensable para la disolución de la matriz mineral,

además de facilitar la actividad de las enzimas proteolíticas que secretan los OC. Entre estas enzimas, la catepsina K y la fosfatasa ácida resistente al tartrato (*Tartrate-resistant acid phosphatase*, TRAP) son las principales responsables del proceso resorptivo [27, 56].

### **Remodelado óseo**

El remodelado óseo es el mecanismo fisiológico por el que de forma continua existe un recambio de la MEC ósea, mediante la actuación coordinada de los OC y los OB. El equilibrio entre los procesos de resorción/formación permite que el proceso tenga lugar sin un cambio neto en la estructura ósea.

El equilibrio para el mantenimiento de la masa ósea está regulado por diversos factores, tanto citoquinas y factores de crecimiento como factores hormonales sistémicos. Las citoquinas pro-inflamatorias como la interleucina (IL)-1, la IL-6 y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* , TNF $\alpha$ ) aceleran la osteoclastogénesis y la resorción ósea. En cambio, diversos factores de crecimiento como el factor de crecimiento insulínico 1 (*insulin-like growth factor 1*, IGF-1), y miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* , TGF $\beta$ ) como el TGF $\beta$  y las proteínas morfogénicas óseas (*bone morphogenetic proteins*, BMPs), tienen un papel principalmente anabólico sobre el hueso [6]. Estos factores son potentes activadores de la actividad osteoblástica, favoreciendo la formación ósea en estudios *in vivo* [130] (Figura 4). En el caso del TGF $\beta$ , ha sido descrita su presencia en forma latente en la matriz ósea, siendo liberado por proteólisis mediante las enzimas MMP-2 y MMP-9 secretadas por los OC durante el proceso de resorción ósea para promover la formación de nuevo hueso por los OB [57, 142].

Entre los factores hormonales, destacan la hormona paratiroidea (*parathyroid hormone*, PTH) y los estrógenos. La finalidad de la PTH es el mantenimiento de la homeostasis del calcio, regulando tanto la osteoclastogénesis y la resorción ósea como la osteoblastogénesis y la formación de hueso. Esta hormona es un péptido de 84 aminoácidos, aunque su actividad biológica reside en su extremo N-terminal, por lo que la molécula PTH[1-34] (teriparatida) ha sido habitualmente usada en estudios clínicos y experimentales [87]. Sin embargo, su efecto sobre el metabolismo del hueso es complejo, ya que su actividad neta es dependiente del tipo de administración. De esta forma, la

administración intermitente parece ejercer un efecto protector sobre la supervivencia de los OB, logrando un aumento de la formación ósea [95]. Así, actualmente está indicada la prescripción de la PTH[1-34] para el tratamiento de la osteoporosis (OP) mediante su administración en dosis intermitentes que conducen a un aumento de la masa ósea, por estimulación de los OB, y una disminución en las fracturas [64].

Los estrógenos también ejercen un papel muy importante en el remodelado óseo, por su capacidad para inhibir la actividad resortiva. Principalmente, los estrógenos actúan reduciendo la osteoclastogénesis mediante la inhibición de la producción de la IL-1, el TNF $\alpha$ , la IL-6, el MCSF y el RANKL, así como induciendo la apoptosis en los OC [91, 210].

Finalmente, la regulación del remodelado óseo también presenta un importante factor mecánico. Existen diversos sistemas sensores de la carga mecánica encargados de regular la proliferación y supervivencia de los OB, así como la mineralización de la matriz ósea. De esta forma, los estímulos mecánicos promueven la formación de hueso, mientras que situaciones de ausencia de carga mecánica tienen un efecto deletéreo sobre este tejido [172].

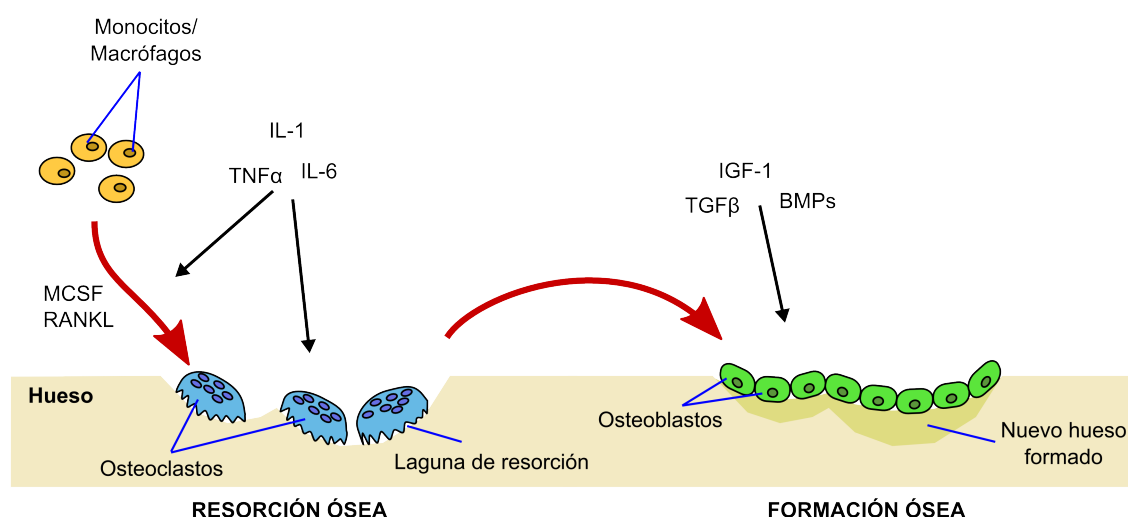


Figura 4. Representación esquemática del proceso del remodelado óseo y las principales moléculas involucradas en su regulación.

### 1.3. La membrana sinovial

La membrana sinovial es el tejido que recubre la cavidad articular. Está formada por

una capa íntima y una capa subíntima. Según la estructura del tejido, la membrana sinovial se clasifica en tres tipos [183] (Figura 5):

- Sinovia areolar: este tejido se caracteriza por una capa íntima superficial más o menos continua bajo la cual aparece una red de capilares sanguíneos seguida de un plexo de arteriolas y vénulas. Puede presentar pliegues que desaparecen al tensarse el tejido.
- Sinovia adiposa: este tipo de tejido sinovial está presente en las almohadillas de grasa y en las vellosidades sinoviales. Presenta una capa íntima completa con una red de capilares superficial, que se sitúa sobre adipocitos, y la matriz suele ser rica en colágenos. La parte más profunda del tejido está formada por tejido adiposo.
- Sinovia fibrosa: es la estructura que resulta más complicada de diferenciar, consistiendo básicamente en un tejido fibroso, como ligamentos o tendones, sobre los que aparece una capa íntima más o menos continua.

Los tipos celulares predominantes en la capa íntima de la membrana sinovial son macrófagos y fibroblastos sinoviales (FS), siendo mayoritarios los FS en el tejido sano. La matriz de esta capa está formada principalmente por ácido hialurónico, estando presentes también otras moléculas como los colágenos III, IV, V y VI, la laminina, la fibronectina y proteoglicanos ricos en condroitin-sulfato. Los FS también se encuentran en la capa subíntima, junto con otros tipos celulares dependiendo del tipo de membrana sinovial que se trate [183].

La membrana sinovial tiene varias funciones en la articulación. Por un lado, las células de la capa íntima producen dos importantes componentes del líquido sinovial: el ácido hialurónico y la lubricina. Estas moléculas de alto peso molecular permiten el deslizamiento de las superficies, impidiendo la adhesión de las distintas estructuras y tejidos y evitando el desgaste del cartílago. Además, en condiciones normales la membrana sinovial no es permeable a estas moléculas, de forma que quedan retenidas en el líquido sinovial a la vez que impiden el acceso y depósito de grandes proteínas plasmáticas en las superficies articulares. El líquido sinovial también es responsable de proporcionar nutrientes al cartílago, los cuales difunden desde la superficie articular hasta las capas más profundas de la matriz cartilaginosa [166, 183, 211]. Por otro lado, el ácido hialurónico

regula la cantidad de líquido sinovial presente en la cavidad articular debido a su alta viscosidad. Así, las alteraciones mecánicas y tensiones generadas por un cambio en el volumen de líquido sinovial inducen modificaciones en la producción de ácido hialurónico por las células sinoviales, de forma que se regula la retención de líquido y el volumen total en la articulación [115].

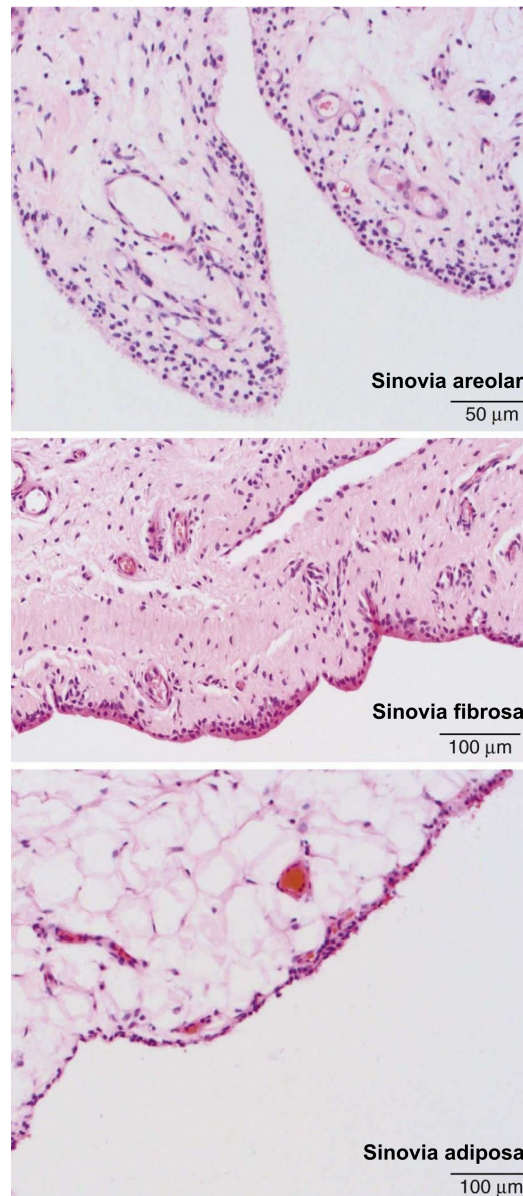


Figura 5. Estructura de los diferentes tipos de membrana sinovial.

## 2. La artrosis

La artrosis (*Osteoarthritis*, OA) es la enfermedad articular más común y una de las principales causas de dolor e incapacidad física en personas de avanzada edad [20]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimaba en 2003 que el 9,6% de los hombres y 18% de las mujeres por encima de 60 años presentaba una OA sintomática [217]. Pese a esta elevada prevalencia, la OA sigue siendo una enfermedad cuya etiopatogenia no es bien conocida, y para la cual no existen estrategias terapéuticas eficaces. Los tratamientos actuales consisten en paliar los síntomas, principalmente el dolor, mediante fármacos con efectos analgésicos o anti-inflamatorios. Distintas recomendaciones para cambiar el estilo de vida, sobre todo aumentar la práctica de ejercicio y la reducción de peso para disminuir la sobrecarga mecánica, también contribuyen a mejorar los síntomas. En estados avanzados de la enfermedad donde estos tratamientos no logran reducir los síntomas, la alternativa existente es el tratamiento quirúrgico, con el reemplazo total de la articulación por una prótesis [20].

A pesar de que la OA se caracteriza por una degeneración progresiva del cartílago articular, también aparecen afectados otros tejidos de la articulación como son el hueso subcondral, la membrana sinovial, los ligamentos, los meniscos y la cápsula. Por ello, clásicamente la OA se consideraba una enfermedad del cartílago, sin embargo, actualmente está aceptada como una afección de toda la articulación y su estudio es abordado desde los diferentes tejidos que la forman, principalmente el cartílago, el hueso subcondral y la membrana sinovial [124] (Figura 6).

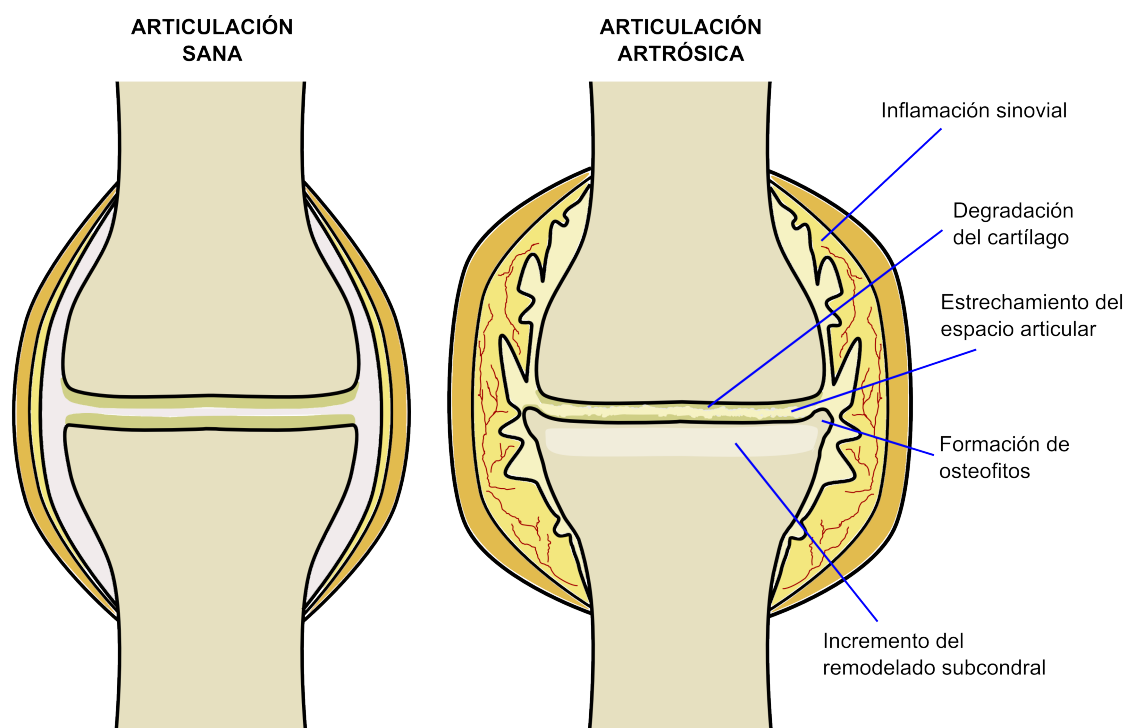


Figura 6. Principales cambios estructurales observados durante el desarrollo de la OA.

## 2.1. Alteraciones tisulares en la OA

Durante el envejecimiento del cartílago, se producen cambios en la composición de la MEC, con una reducción en el recambio de sus componentes y una alteración en el contenido de GAG, así como un aumento de productos de la glicación avanzada. También ocurre un proceso de entrecruzamiento no enzimático de fibras de colágeno, así como acortamiento y degradación de las moléculas de agregano. Todas estas alteraciones incrementan la fragilidad del cartílago y aceleran el proceso senescente de los condrocitos. En consecuencia, empeora la capacidad de retención de agua en la MEC y con ella la biomecánica del cartílago, debido a una distribución anómala de la carga en la unión osteocondral [116, 124, 171, 173].

Esta debilidad estructural de carácter bioquímico asociada al envejecimiento puede desencadenarse también por otros factores de riesgo, y facilitar que las primeras alteraciones del cartílago durante la OA aparezcan en las zonas donde la carga mecánica articular fisiológica es mayor. En un cartílago normal, los condrocitos se mantienen en un estado quiescente necesario para el mantenimiento y reparación del cartílago, en el que



existe una fina regulación entre la síntesis y la degradación de la MEC. En cambio, estas células pueden ser activadas por la estimulación de diversos receptores específicos en respuesta a estrés mecánico, factores inflamatorios y, también, fragmentos de moléculas de la matriz [124]. Tras recibir este tipo de estímulos, los condrocitos son activados en un intento de reparación de la matriz, con síntesis de moléculas como el COL2 y el agregano. Sin embargo, en la OA se produce un desequilibrio en el balance entre los estímulos anabólicos y catabólicos, que lleva a una pérdida del control homeostático de la síntesis y degradación de componentes de la MEC [72].

En las etapas tempranas de la OA, el aumento de la secreción de proteasas condiciona una degradación de la matriz. En un intento compensatorio, los condrocitos aumentan su proliferación y la producción del COL2 y de proteoglicanos. Sin embargo, según avanza la enfermedad, la gran cantidad de proteasas de la matriz hace que esta síntesis sea insuficiente y el proceso se desplaza hacia la vertiente catabólica, llevando a la pérdida casi total de la MEC [171, 207]. Además de la pérdida de componentes de la matriz, en las etapas avanzadas aparece un engrosamiento del cartílago calcificado con un avance del frente de calcificación. Estos cambios van asociados a una alteración fenotípica de los condrocitos, que expresan marcadores asociados a estados de diferenciación hipertrófica como son el COL10 y la metaloproteasa de matriz 13 (MMP-13), y también otros como Runx2, Indian Hedgehog, osteocalcina, etc. Esto ha llevado a describir la aparición de condrocitos “tipo hipertrófico” en el cartílago artrósico, con una recapitulación del proceso de diferenciación de los condrocitos, alcanzando estados de diferenciación terminal. La calcificación del cartílago en estas etapas de la enfermedad podría por tanto ocurrir por un proceso similar a la osificación endocondral [72, 105].

Además del propio cartílago, otros tejidos de la articulación intervienen en la progresión de la OA. En este proceso, la contribución del hueso subcondral es compleja pero muy relevante [34].

La OA se ha asociado clásicamente a esclerosis subcondral, ya que aparece con frecuencia en forma de lesión ósea en los estados avanzados de la enfermedad. Sin embargo, nuestro grupo ha demostrado que un incremento de la tasa de remodelado subcondral con pérdida de masa ósea está asociado con mayor daño en el cartílago en conejos con OA precedida de OP [13]. Estudios en humanos también han mostrado la

existencia de un aumento de la resorción ósea en estados tempranos de la enfermedad [18, 23, 41]. Los cambios en la distribución de la carga y la resistencia del hueso debido a este aumento del remodelado podrían ser los responsables del daño en el cartílago [28, 34]. Sin embargo, no se conoce bien la causa de este fenómeno, aunque las microfisuras que se producen en la placa cortical durante el funcionamiento normal de la articulación podrían ser el origen de los focos de mayor remodelado subcondral [133, 189].

Con el avance de la enfermedad, la tasa de remodelado óseo se incrementa y se produce una desviación del balance neto hacia el anabolismo. Además, las alteraciones biomecánicas junto con el deterioro del cartílago llevan a una sobrecarga del hueso subcondral en la zona dañada, que también se traduce en un aumento de la formación ósea. Todo esto conduce a la conocida esclerosis subcondral, característica de los estados avanzados de la OA. En cambio, al contrario de lo que ocurre con la OP, no se ha relacionado el aumento de la densidad ósea en sí mismo con un mayor progreso de la OA en modelos animales [28, 84].

Los osteofitos son proliferaciones osteocondrales características de la OA, origen de dolor y pérdida de función articular en los enfermos. Están constituidos por una base ósea cubierta por cartílago, que se genera a partir de la diferenciación de células mesenquimales en la unión osteocondral [104]. Aunque no está claro el papel que los osteofitos desempeñan en la patogenia de la OA, se ha sugerido que fueran estructuras de índole reparadora que podrían contribuir a la estabilización de la articulación dañada [124].

Finalmente, Ayral y colaboradores determinaron que el 50% de los pacientes con OA sintomática presentaban inflamación sinovial, que además se correlacionó con una peor evolución de la enfermedad [10]. Incluso otros autores han mostrado que tanto en la OA temprana como en la avanzada se produce algún tipo de alteración sinovial [141]. Aunque esta sinovitis es más localizada y de menor grado que la encontrada durante la artritis reumatoide (AR), también se caracteriza por la presencia de infiltrado macrofágico y linfocitario, hiperplasia de la capa íntima, aumento de la vascularización y fibrosis en etapas avanzadas de la enfermedad [124]. La alteración en la concentración de ácido hialurónico y de lubricina en el líquido sinovial durante la OA contribuye al deterioro del cartílago. A su vez, un aumento de la permeabilidad de la membrana sinovial permite la difusión de moléculas del líquido sinovial al torrente sanguíneo y viceversa. Así, pueden

encontrarse niveles elevados de ácido hialurónico en plasma y, además, aumento de proteínas plasmáticas con capacidad pro-inflamatoria en el líquido sinovial [166, 188]. El origen de la sinoviopatía en la OA se ha relacionado con la presencia de microcristales, estrés mecánico y los propios fragmentos de cartílago liberados al líquido sinovial, que actuarían como factores pro-inflamatorios [173].

## **2.2. Mediadores de la patogénesis de la artrosis**

### ***Estrés mecánico***

Como hemos comentado anteriormente, todo este proceso catabólico condrocitario de la OA se desencadena por diferentes estímulos. El estrés por alteraciones mecánicas tiene un importante papel en la activación de los condrocitos y la estimulación de la producción de enzimas degradantes de la matriz cartilaginosa. La inestabilidad de la articulación puede producir cambios similares debido a la acumulación de la carga en determinadas regiones.

El remodelado óseo también está marcado por los estímulos mecánicos. Es el caso de la producción de TGF $\beta$  en el hueso subcondral, que es estimulada por cambios en la carga mecánica y lleva a un reclutamiento de células madre mesenquimales [228]. Estas alteraciones en el remodelado dan como resultado modificaciones en la arquitectura del hueso que a su vez perturba la normalidad biomecánica de la unidad osteocondral. El estrés mecánico incluso puede promover la inflamación de la membrana sinovial y el hueso subcondral [56, 78, 162, 173].

La OA es el prototipo de enfermedad biomecánica. En consecuencia, los desequilibrios mecánicos terminan modificando la señalización de diferentes vías intracelulares, transformando las fuerzas mecánicas sobre los condrocitos en una respuesta biológica, con producción de mediadores moleculares. En este sentido, las citoquinas pro-inflamatorias y las enzimas catabólicas son los brazos efectores finales del daño tisular.

### ***Factores pro-inflamatorios***

Los condrocitos del cartílago articular, las células de la membrana sinovial inflamada y los OB del hueso subcondral artrósico, producen y secretan las citoquinas pro-inflamatorias que contribuirán al deterioro tisular. Las principales citoquinas pro-inflamatorias en la patogenia de la OA son la IL-1 y el TNF $\alpha$ , y su efecto sobre los

condrocitos ha sido ampliamente estudiado. Son capaces de inducir la expresión de proteasas, que degradan la MEC del cartílago, pero también de otras moléculas que participan en la perpetuación de la respuesta inflamatoria, como son la prostaglandina E2 (PGE2), el óxido nítrico, la IL-6, la IL-8 y la IL-17. Así mismo, estas citoquinas contribuyen a la alteración de la MEC del cartílago OA al reducir la expresión del COL2 e incrementar la de otros colágenos como el COL1 y el COL3 [71, 173, 207].

La respuesta inmune innata mediada por los receptores de tipo Toll (*Toll-like receptors*, TLRs) también juega un papel muy relevante en el desarrollo de la OA. Estos receptores pueden activarse por patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), pero también por moléculas del propio organismo asociadas a daño tisular (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs). De todos los TLRs, el TLR4 ha sido identificado como un importante mediador de estas respuestas en la OA. Además de PAMPs como el lipopolisacárido bacteriano (LPS), numerosos DAMPs desencadenan la señalización por el TLR4 en la OA. Es el caso de la fibronectina, el ácido hialurónico, las proteínas de la familia amiloide sérica A, las proteínas S100A8 y S100A9 y los ácidos grasos libres, pero también el de proteínas plasmáticas que aparecen en el líquido sinovial debido a la mayor permeabilidad de la membrana sinovial por la inflamación. Todas las células relacionadas con el desarrollo de la OA (condrocitos, FS, OB y OC) expresan el TLR4, lo que implica que esta señalización puede participar en la progresión de la enfermedad desde los distintos tejidos articulares. De hecho, la activación del TLR4 induce la producción de proteasas y de factores pro-inflamatorios (IL-1, IL-6, NO, PGE2, proteína quimioatrayente de monocitos —*monocyte chemoattractant protein 1*, MCP-1—) en los distintos tejidos articulares, pero también reduce la síntesis del COL2 y el agrecano en el cartílago. Además es responsable de las alteraciones en el remodelado óseo durante los procesos de inflamación articular [75].

### **Factores catabólicos**

La inflamación es responsable de la activación de las células de los distintos tejidos articulares, con proliferación, alteración de la reparación tisular y perpetuación de la respuesta inflamatoria. Pero tanto la inflamación como el estrés mecánico inducen la producción de los factores catabólicos que son indispensables para el deterioro tisular que existe en la OA. Todos los principales tejidos articulares, el cartílago, la membrana sinovial

y el hueso subcondral, participan en este proceso mediante la secreción de enzimas proteolíticas específicas.

La degradación del agregano es un evento clave en las fases tempranas del desarrollo de la OA. Esta actividad es debida principalmente a unas metaloproteasas dependientes de zinc (superfamilia metzincin) llamadas disintegrinas y metaloproteinasas con motivos de trombospodina (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*, ADAMTS). De este grupo, la ADAMTS-4 y la ADAMTS-5 son las mayores responsables de la digestión del agregano presente en la matriz del cartílago durante la OA [203].

Además de estas enzimas, otras pertenecientes a la misma superfamilia son las metaloproteasas de matriz (MMPs). En este grupo se engloban las llamadas colagenasas, que degradan el otro componente principal de la MEC del cartílago: el colágeno de tipo II. Entre las colagenasas, la MMP-1 y la MMP-13 son las más importantes en la evolución en la OA. De hecho, estudios en animales han demostrado que son imprescindibles para el desarrollo de la enfermedad. La MMP-3 es la MMP más expresada en el cartílago OA y, a pesar de que actúa sobre diferentes proteínas de matriz como la fibronectina, la laminina, los proteoglicanos y diversos colágenos, su principal papel en el desarrollo de la enfermedad parece estar relacionado con la activación proteolítica de otras MMPs, que son sintetizadas como pro-enzimas [203]. Entre las MMPs con actividad gelatinasa, destaca la MMP-9, cuya expresión se ha encontrado elevada en el cartílago OA, siendo casi indetectable en el cartílago sano [67, 187], y es inducida en los condrocitos por el estrés mecánico [96]. Además su actividad ha sido detectada en líquido sinovial de enfermos con distintas patologías articulares tanto en forma de monómero como de dímero, y formando complejos con otras proteínas [79, 129, 147].

Las catepsinas son otra familia de proteasas involucradas en los procesos catabólicos de la OA. La catepsina B es encargada de degradar proteínas extracelulares, así como de activar las MMPs. En el caso de las catepsinas K y L, su principal función es participar en la degradación del colágeno y en el remodelado de la matriz ósea. Además, en los últimos años se ha demostrado que la actividad de la catepsina K está incrementada en el cartílago OA, contribuyendo a la degradación del colágeno y la pérdida de la matriz de este tejido [59, 102, 173].

### 3. Factores de riesgo asociados a la artrosis

Diversos factores, tanto sistémicos como locales, han sido asociados al desarrollo de la OA. Edad, sexo, densidad mineral ósea, estado hormonal y obesidad, pero también factores mecánicos como un mal alineamiento de la articulación y traumas previos, son condiciones relacionadas con un mayor riesgo de desarrollo de esta enfermedad [65]. Asimismo, se han encontrado diversas alteraciones en genes que codifican para componentes de la matriz del cartílago y para proteínas reguladoras del metabolismo de los condrocitos y los OB, así como del desarrollo endocondral, las cuales parecen estar asociadas con una mayor predisposición al desarrollo de la OA [154].

Estos factores de riesgo de la OA emergen como importantes dianas de estudio con el objetivo de prevenir o incluso revertir el desarrollo de la enfermedad. Para ello, es necesario un mayor conocimiento de las vías patogénicas a través de las cuales actúan estos factores de riesgo para lograr descubrir potenciales estrategias terapéuticas.

**De los diferentes niveles etiopatogénicos comentados previamente, esta tesis ha abordado los siguientes factores asociados a la OA: la menopausia, a través del déficit estrogénico, y la obesidad, a través de las adipocinas como mediadoras de sus efectos metabólicos y mecánicos.**

#### 3.1. Menopausia, déficit estrogénico y artrosis

La OA está íntimamente asociada al envejecimiento. Sin embargo, por encima de los 45-50 años el riesgo de esta enfermedad se acelera en las mujeres, mientras que en los hombres continúa aumentando progresivamente. De esta forma, entre los 50 y los 60 años, la prevalencia de OA es más de tres veces mayor en mujeres que en hombres [149].

Este incremento de la prevalencia de la OA en mujeres durante la menopausia ha llevado a numerosos estudios a determinar la relación entre los niveles circulantes de estrógenos, drásticamente reducidos durante la menopausia, y el desarrollo de la OA.

Los condrocitos expresan los receptores de estrógenos (*estrogen receptor*, ER)  $\alpha$  y  $\beta$ , lo que indica que estas células son capaces de responder a estas hormonas [208]. De hecho, varios estudios han mostrado el efecto beneficioso de los estrógenos en la funcionalidad del cartílago, por aumento de la proliferación y protección frente a la apoptosis de los condrocitos, así como reducción de los mediadores inflamatorios y catabólicos sintetizados

por estas células [36, 46, 47, 155].

Sin embargo, a pesar de resultados experimentales en los que la ovariectomía en conejos lleva a un incremento en el daño en el cartílago [33], no se ha encontrado una correlación definitiva entre los estrógenos circulantes y el desarrollo de la OA [117]. Además, diversos estudios han evaluado el efecto de la administración de estrógenos sobre el desarrollo de la OA. Aunque en el caso de los moduladores selectivos de receptores de estrógenos (*selective estrogen receptor modulators*, SERMs) parece existir un beneficio para la enfermedad, en la terapia sustitutiva con estrógenos no se ha encontrado una clara relación [126, 156].

Además de los estrógenos disponibles a nivel sistémico, diversos tejidos extragonadales como el cerebro, el tejido adiposo o las arterias son capaces de producir estrógenos a nivel local. Este mecanismo tiene lugar a través de la enzima aromatasa, que produce la aromatización de andrógenos (testosterona o androstenediona) para dar lugar a estrógenos (estradiol o estrona, respectivamente) [180] (Figura 7). La ausencia de evidencias que relacionen los estrógenos sistémicos con la OA permite hipotetizar que esta producción de estrógenos locales en la articulación podría tener un importante papel en la protección frente a la OA [117].

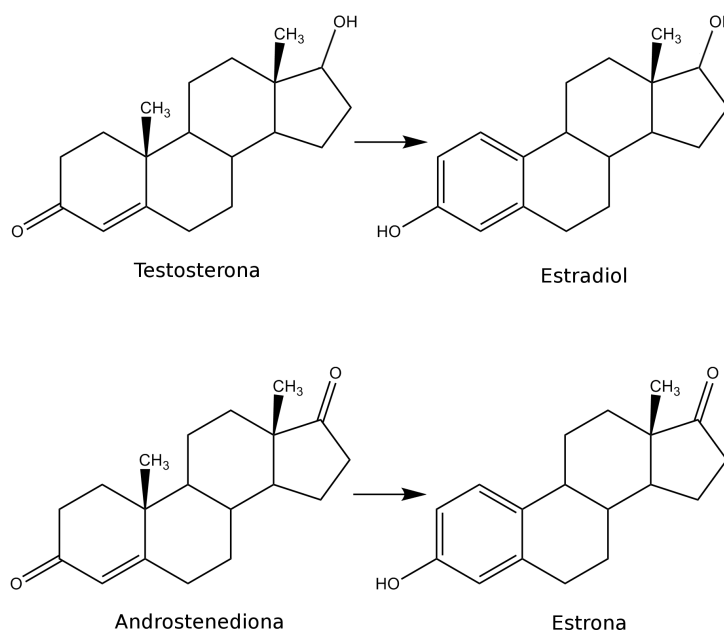


Figura 7. Reacciones catalizadas por la enzima aromatasa.

Existen estudios sobre la expresión de la aromatasa tanto en el hueso como en la membrana sinovial. Esta enzima se ha detectado en ambos tejidos, presentando una correlación positiva en el hueso con el grado de OP y una menor expresión en el hueso OA que en el hueso procedente de fractura [12, 85, 164, 169]. Sin embargo, pocos trabajos han abordado su expresión en el cartílago articular.

La expresión de aromatasa ha sido detectada en la placa de crecimiento y en condrocitos cultivados de ratas [62, 197, 198], pero en humanos sólo se ha detectado en placa de crecimiento por inmunohistoquímica [144]. **En cambio, no existen estudios en profundidad sobre el posible papel de la síntesis local de estrógenos a través de esta enzima en el mantenimiento del cartílago hialino humano maduro.**

### **3.2. Síndrome metabólico, obesidad y artrosis**

#### ***Síndrome metabólico***

Desde hace varias décadas, la obesidad ha sido asociada al desarrollo de la OA. Inicialmente se asignó a este factor un papel principalmente mecánico debido a la sobrecarga de las articulaciones, capaz de inducir respuestas pro-inflamatorias y catabólicas. Sin embargo, también existe una correlación entre la OA de articulaciones que no soportan peso, como las de la mano, y el índice de masa corporal. Este hallazgo epidemiológico ha contribuido a la investigación del factor obesidad en la OA desde su vertiente no sólo mecánica sino también metabólica, donde la obesidad sería un factor de riesgo asociado a la OA como un componente más del síndrome metabólico (SMet) [229].

Existe una mayor incidencia de SMet en pacientes con OA, siendo la prevalencia del 59% en pacientes con OA frente a sólo 23% en el resto de la población. Según la Federación Internacional de Diabetes, el SMet se define por la presencia de obesidad abdominal junto con al menos dos de los siguientes parámetros: hipertensión, hiperglicemia y dislipidemia (aumento de triglicéridos y/o disminución de lipoproteínas de alta densidad —*high density lipoprotein*, HDL—) [5]. Además de presentar una mayor prevalencia en pacientes con OA [63, 150], es destacable que todos estos factores han sido además relacionados con la evolución de esta enfermedad de distintas maneras (Figura 8).

A pesar de que la hipertensión se ha relacionado con el desarrollo de la OA en diversos estudios, el papel que jugaría esta patología en la evolución de la OA no está bien



establecido. Existen teorías que indican que el daño endotelial y la alteración en el crecimiento vascular podrían derivar en una reducción del flujo sanguíneo en el hueso subcondral [66]. Además de la reducción en el aporte de nutrientes al cartílago, esta isquemia subcondral participaría en la inducción de apoptosis en los osteocitos [229].

En el caso de la hiperglicemia, existen efectos deletéreos en la articulación debidos al estrés oxidativo y la formación de productos de la glicación avanzada, que alterarían las propiedades del hueso subcondral y el metabolismo condrocitario. Además, la hiperglicemia conlleva disfunción motora y sensitiva que puede derivar en debilidad muscular, junto con inflamación sistémica de bajo grado sostenida en el tiempo que contribuye al aumento del estrés oxidativo. La acumulación de todos estos factores parece ser responsables de un aumento del catabolismo del cartílago y de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias que participan en el desarrollo de la OA [229].

Por otro lado, la dislipidemia ha sido ampliamente estudiada en la OA, con varios estudios describiendo una asociación entre la hipercolesterolemia y esta enfermedad [4, 83, 193]. De hecho, se ha descrito en la OA un metabolismo alterado del colesterol en el cartílago, con menor expresión del receptor X hepático (*liver X receptor*, LXR), de la apolipoproteína A1 (ApoA1) y del receptor 1 de las lipoproteínas de baja densidad (*low density lipoprotein*, LDL) oxidadas (LDLox), llamado también receptor 1 de LDLox de tipo leptina (*leptin-type oxidized LDL receptor 1*, LOX-1). Esto implica un transporte alterado del colesterol en la membrana de los condrocitos, con la consiguiente acumulación intracelular [204]. De acuerdo con esto, se ha descrito la acumulación del colesterol en la superficie del cartílago artrósico [45]. Además, esta relación del metabolismo del colesterol con la OA se ha confirmado en modelos animales, ya que ratones con un transporte alterado de lipoproteínas por mutación del gen ApoA1 desarrollan de forma espontánea OA cuando son alimentados con dieta de tipo occidental [202].

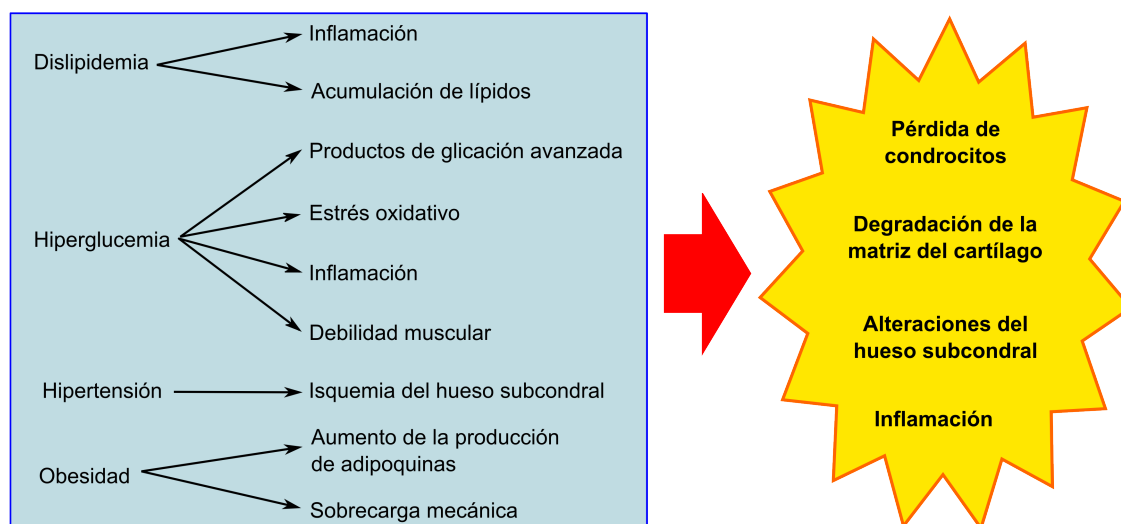


Figura 8. Esquema representativo de los diferentes componentes del síndrome metabólico y su contribución al desarrollo de la OA.

### **Obesidad y adipoquinas**

La obesidad, como hemos indicado anteriormente, es un factor de riesgo para la OA debido a la sobrecarga directa que el peso ejerce sobre las articulaciones. Se produce una estimulación de mecanorreceptores en los condrocitos y los OB que activan la liberación de citoquinas y otros factores pro-inflamatorios, así como de enzimas degradantes de la MEC. Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, la asociación entre la obesidad y la OA de articulaciones no sometidas a carga mecánica como la trapeziometacarpiana, sugiere la existencia de un componente metabólico en la obesidad que favorecería la progresión de la OA [148].

El tejido adiposo es actualmente considerado un órgano endocrino capaz de producir una gran cantidad de factores llamados “adipoquinas”, estando algunas de ellas relacionadas con el mantenimiento de la inflamación sistémica asociada a la obesidad [73]. Sin embargo, estos factores son mucho más ubicuos, teniendo diferentes acciones según el tejido que las produzca y sobre el que actúen. Por este motivo, han sido estudiadas en diversas enfermedades, como las enfermedades reumáticas [73, 109].

Las adipoquinas más estudiadas son la leptina y la adiponectina, pero también la resistina y la visfatina. Todas ellas tienen un efecto deletéreo sobre los tejidos articulares en la OA, incluida la adiponectina que, al contrario que las demás, presenta un perfil anti-

inflamatorio a nivel sistémico en las enfermedades cardiovasculares. Estas adipoquinas han sido detectadas tanto en el plasma como en el líquido sinovial de pacientes con OA, siendo la grasa infrapatelar y la membrana sinovial las principales fuentes productoras a nivel articular [48, 53, 89, 148, 194]. Estas adipoquinas son potentes inductores de la síntesis de factores pro-inflamatorios y catabólicos en los condrocitos y los FS, así como inhibidores de la expresión de los componentes de la matriz del cartílago. La leptina, además, se ha relacionado con la función alterada de los OB durante la OA [52, 109, 148, 194].

La lipocalina 2 (LCN2) es otra adipoquina que en los últimos años ha sido también asociada a las enfermedades reumáticas. También conocida como siderocalina, 24p3 o lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*, NGAL), esta pequeña glicoproteína de 25KDa puede aparecer en forma de monómeros, dímeros y unida a MMP-9 [101, 212]. Se conocen actualmente dos receptores: la megalina o proteína relacionada con el receptor de LDL 2 (*LDL receptor-related protein 2*, Lrp2), y el transportador de cationes orgánicos de tipo cerebral (*brain-type organic cation transporter*, BOCT). Ambos receptores han sido relacionados con la internalización de la LCN2 mediante un proceso de endocitosis [60, 90]. También ha sido descrito el transporte inverso de la LCN2 mediante endosomas de reciclaje [42, 60]. Así, esta adipoquina es capaz de unir pequeños compuestos como esteroides, LPS, e incluso iones de hierro, permitiendo el tráfico de estas moléculas entre el interior y el exterior celular. Estas propiedades se traducen en distintos efectos sobre las células en las que actúa, estando relacionada, entre otros procesos, con la modulación de la viabilidad celular. Así, en células cancerosas es capaz de promover el crecimiento tumoral y la invasividad [114]. Sin embargo, en situaciones no tumorales presenta diferentes efectos, induciendo apoptosis en cardiomiocitos por acumulación de hierro intracelular [219] mientras que en células hepáticas resulta protectora frente a una lesión tisular [25]. En el caso de las células madre mesenquimales, la LCN2 parece tener también un papel protector frente a las alteraciones del microambiente de la médula osea [80]. Esta adipoquina también se ha relacionado con otros procesos fisiopatológicos como la defensa frente a infecciones bacterianas y a situaciones de isquemia tisular [178, 190]. Además, participa en procesos catabólicos a través de la estabilización de la MMP-9, uniéndose covalentemente a esta enzima y evitando su autodegradación. De hecho, la LCN2 ha sido detectada en líquido sinovial de

pacientes con OA unida a la MMP-9, aumentando la actividad proteolítica de esta enzima [79].

Los niveles circulantes de la LCN2 se asocian directamente con la obesidad, la inflamación crónica y las complicaciones metabólicas, proponiéndose como un biomarcador de alteraciones metabólicas relacionadas con la obesidad.

Los condrocitos se encuentran entre los diferentes tipos celulares que expresan la LCN2, cuya expresión se ve incrementada durante la diferenciación hipertrófica. Además, diversos estímulos como la IL-1 $\beta$ , la dexametasona (Dx), el LPS, el óxido nítrico, la adiponectina y la leptina son capaces de inducir la expresión de la LCN2 en estas células [51, 74, 143, 206]. En cuanto a su efecto sobre los condrocitos, la LCN2 reduce el aumento de vitalidad inducido por factores de crecimiento [74, 98, 143].

Además de la relación de esta adipoquina con factores metabólicos, la expresión de la LCN2 también es altamente modulable desde un punto de vista mecánico. De hecho, a pesar de que su regulación se encuentra poco estudiada en los OB, se conoce que no sólo factores pro-inflamatorios presentes en la OA como son el TNF $\alpha$  y la IL-17 regulan su expresión en estas células [176], sino que la LCN2 es también el gen más inducido en OB de ratón en condiciones de ausencia de carga mecánica [31]. Por último, la sobreexpresión de la LCN2 en ratones transgénicos está relacionada con el desarrollo y el remodelado óseo, produciendo alteraciones en la microestructura y en el crecimiento de los huesos [55]. Por su parte, en la membrana sinovial, la estimulación de sinoviocitos con la LCN2 produce un aumento de diversas proteínas como la catepsina D [98].

**Por lo tanto, el estado del conocimiento actual muestra que la LCN2 actúa sobre distintos tejidos articulares involucrados en el desarrollo de la OA, pero aún no se ha demostrado su participación en la patogenia de la enfermedad.**

#### **4. Tratamiento farmacológico de la artrosis**

Pese a ser una enfermedad con una alta prevalencia en los países desarrollados, la OA sigue siendo una enfermedad huérfana de opciones terapéuticas eficaces. Los tratamientos actuales principalmente están dirigidos a reducir el dolor y la inflamación con la finalidad de mejorar la funcionalidad de la articulación. Las estrategias terapéuticas existentes son de tres tipos: no farmacológicas, farmacológicas y quirúrgicas [20].

Entre las primeras estrategias, destacan los cambios en hábitos de vida del paciente, como son reducir peso y realizar ejercicio para fortalecer la musculatura. Las opciones farmacológicas disponibles para los pacientes con OA básicamente son tratamientos anti-inflamatorios. Paracetamol, anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) e inhibidores específicos de ciclooxigenasa (COX)-2 como celecoxib, así como los glucocorticoides intra-articulares en el caso de brotes inflamatorios, han mostrado ser eficaces en la reducción de la inflamación. Además existen los conocidos como fármacos de acción lenta modificadores de los síntomas de la OA (*symptomatic slow-acting drugs for osteoarthritis*, SYSADOAs), como son el sulfato de glucosamina, el condroitín-sulfato y el ácido hialurónico. El reemplazo completo de la articulación por una prótesis es la opción más efectiva en los pacientes con una enfermedad muy avanzada en los cuales los tratamientos anteriores no logran mejorar los síntomas [20].

Es importante destacar que todas estas aproximaciones son tratamientos sintomáticos, cuya finalidad es únicamente paliar el dolor y, como consecuencia, mejorar la función. Por ello, con el objetivo de modificar el curso natural de la enfermedad, diversos estudios han abordado el diseño de fármacos que pueden actuar sobre mecanismos patogénicos, como son la inhibición de citoquinas o proteasas. Serían los compuestos conocidos como fármacos modificadores de la enfermedad artrósica (*disease-modifying OA drugs*, DMOADs). La neutralización de la IL-1 y el TNF $\alpha$ , las principales citoquinas involucradas en el avance de esta enfermedad, se ha planteado en varios ensayos clínicos. A pesar del papel asignado a ambas en la patogenia de la OA, su bloqueo no atenúa el progreso de la enfermedad [40, 128], al igual que tampoco lo logra un inhibidor selectivo de MMPs [108]. Estos resultados resaltan la complejidad de los eventos moleculares involucrados en la OA, y sugieren que la inhibición de un único efector catabólico es insuficiente para el tratamiento.

De esta forma, actualmente está emergiendo una nueva estrategia terapéutica cuya finalidad es combinar fármacos con capacidad para inhibir varios mecanismos patogénicos, dianas terapéuticas o vías de señalización intracelular al mismo tiempo. Así, en función de las características de la patología en cada paciente, se individualizaría el tratamiento farmacológico [201]. Siguiendo esta estrategia, sería interesante desarrollar moléculas con efectos duales, evitando la necesidad de utilizar combinaciones de medicamentos. Para

ello, es necesario investigar posibles propiedades adicionales durante la búsqueda de nuevos fármacos, así como en aquellos ya descritos o incluso comercializados. Este es el caso de la PTH[1-34], que desde 2003 se encuentra autorizada por la Agencia Española del Medicamento como Forsteo (Teriparatida) para el tratamiento de la OP [2]. Nuestro grupo ha descrito en un modelo animal de OA agravada por OP, que esta molécula administrada de forma intermitente, tiene la capacidad prevenir la progresión de la OA al mejorar la calidad del hueso subcondral [14]. Esta estrategia podría abrir nuevas opciones terapéuticas, por las que algunos fármacos debido a su acción específica en determinados tejidos articulares tendría una indicación clara en determinados fenotipos fisiopatológicos de la enfermedad.

Otra alternativa terapéutica surge de las propiedades presentes en los productos naturales consumidos habitualmente por los pacientes. Diversos ensayos clínicos han demostrado la eficacia en el tratamiento de los síntomas de la OA de algunas de estas moléculas derivadas de plantas, como el aceite de soja o de aguacate o extractos de piña, así como de nutrientes como las vitaminas B, C y E o los ácidos grasos  $\omega$ -3 [7]. En el caso del jengibre, su efecto anti-inflamatorio ha sido estudiado en diversos trabajos, atraídos por su uso en la medicina tradicional china para el tratamiento de enfermedades reumáticas como la OA [61, 196, 200]. Sin embargo, no se conoce en profundidad el mecanismo por el cuál los principios activos del jengibre ejercen su potencial efecto anti-inflamatorio y anti-catabólico en el cartílago.

**Por tanto, la complejidad de la OA sugiere la necesidad de un nuevo enfoque terapéutico que requiere la investigación de fármacos con potencial efecto sobre múltiples aspectos de la enfermedad, así como el estudio de productos naturales que podrían ser prometedores principios activos para el tratamiento de la OA. De esta forma, se podría lograr pautar un sólo fármaco en función de la evolución de cada paciente para tratar los distintos procesos que estén activos en cada caso.**

## **II.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Como hemos indicado en la introducción, la artrosis cuenta actualmente con escasas opciones de terapia farmacológica, y todas ellas están dirigidas a controlar los síntomas de la enfermedad, no a modificar su curso natural. En esta tesis nos hemos planteado buscar, desde una aproximación fisiopatológica, potenciales dianas terapéuticas que pudieran ralentizar, o incluso revertir, la evolución de la enfermedad. De esta forma, profundizar en el conocimiento de las vías patogénicas a través de las cuales actúan factores de riesgo para la OA como son el déficit estrogénico y los componentes metabólico y biomecánico asociados a la obesidad nos permitiría descubrir nuevas estrategias terapéuticas.

Para ello, hemos investigado los factores etio-patogénicos que hemos considerado más relevantes y factibles de ser modulados farmacológicamente.

Desde otra perspectiva diferente, nos hemos preguntado si fármacos con una diana tisular articular bien definida, podrían actuar en otros tejidos articulares. La posibilidad de que algunos de estos fármacos puedan actuar en varias de las estructuras anatómicas que conforman la articulación y que, por supuesto, participan en la patogenia de la enfermedad, constituiría otra forma novedosa de plantear una estrategia terapéutica en la OA, basada en la individualización de tratamientos.

Por tanto, los objetivos de esta tesis se agrupan en dos grandes apartados:

A) En primer lugar, se analizarán vías fisiopatogénicas relevantes en la OA, con la finalidad de buscar nuevos abordajes terapéuticos de esta enfermedad. De esta forma, se establecen los siguientes subobjetivos:

1. Estudiar la síntesis local de estrógenos en condrocitos cultivados y en el cartílago articular humano a través de la enzima aromatasa, y su posible relevancia fisiológica como mecanismo protector frente al desarrollo de la OA durante la deficiencia estrogénica que tiene lugar en las mujeres menopáusicas.
2. Determinar el efecto de la lipocalina-2, una adipoquina con propiedades catabólicas, sobre la fisiología del hueso y su posible papel en la relación hueso-cartílago en el contexto de una aproximación *in vitro* a la artrosis.

B) Por otro lado, se estudiarán dos compuestos distintos, ambos con potencial efecto anti-OA, desde una perspectiva patogénica de la enfermedad, buscando detectar su acción en



otros tejidos articulares, con dos subobjetivos:

3. Evaluar el efecto de la administración intermitente de la PTH[1-34] en la sinovitis de un modelo animal de OA agravada por osteoporosis en el que nuestro grupo ya ha descrito previamente su papel beneficioso sobre el cartílago y el hueso subcondral.
4. Analizar las propiedades de un principio activo natural derivado del jengibre sobre condrocitos artrósicos humanos, ya que potencialmente podría ser un tratamiento anti-inflamatorio y anti-catabólico en el cartílago artrósico pero también un agente anti-resortivo en el hueso.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 1. Pacientes

Para los estudios con muestras humanas, se seleccionaron pacientes con OA primaria de sexo femenino entre 55 y 80 años, que fueron sometidos a una artroplasia total de rodilla en el servicio de Cirugía Ortopédica del IIS Fundación Jiménez Díaz. Todos ellos presentaban evidencias clínicas y radiológicas de OA, de acuerdo con los criterios de la Sociedad Americana de Reumatología.

Las muestras de cartílago control se obtuvieron de 3 donantes sanos de sexo femenino de 65, 66 y 67 años, sin evidencias clínicas ni macroscópicas de patología articular, a través del Servicio de Trasplantes del Hospital Clínico de Barcelona.

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del IIS Fundación Jiménez Díaz, y se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes incluidos en el estudio.

### 2. Modelo animal

Para el estudio en animales con OA agravada por una OP previa, se utilizaron conejos albinos hembra de raza Nueva Zelanda (NZW) adquiridos en Granja Universal (Pamplona, España). Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la legislación española vigente (RD1201/2005) y las directrices de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, escritas por los Institutos Nacionales de la Salud (Bethesda, MD, EEUU), y fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del IIS Fundación Jiménez Díaz.

Las conejas utilizadas eran esqueléticamente maduras, de 8 meses de edad y con un peso entre 3,8 y 4,8kg. Antes de iniciar los diferentes experimentos, los animales fueron aclimatados durante dos semanas en jaulas individuales. Las condiciones ambientales fueron mantenidas constantes a lo largo de todo el estudio, consistiendo en ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad a temperatura ambiente, con acceso *ad libitum* al agua y pienso comercial estándar para conejos (Panlab, Barcelona). Todos los procedimientos quirúrgicos fueron realizados bajo anestesia general del animal, administrando por vía intramuscular hidrocloreuro de xilacina (Ronpum, Bayer Healthcare + KVP Pharma, Kiel, Alemania) y ketamina (Ketolar, Pfizer Ireland Pharmaceuticals, Dublin, Irlanda), en

proporción 1:2. El día de la intervención y dos días después se administraron por la misma vía cefonicid 150mg/Kg/día (cefonicid CombinoPharm, Reig Jofré, Barcelona, España) a modo de profilaxis antibiótica y metamizol magnésico 30mg/kg/día (Nolotil, Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Alemania), como tratamiento analgésico.

La OP fue inducida en 20 animales mediante ovariectomía bilateral (OVX) junto con administración intramuscular de 1mg/kg/día de metilprednisolona (MPH) durante 4 semanas de acuerdo con el esquema de trabajo indicado en la figura 9. En la semana 7 desde la OVX, se realizó menistectomía medial parcial y sección del ligamento cruzado anterior en la rodilla izquierda de estos animales para provocar el desarrollo de OA. En la semana 12, la mitad de estos animales comenzaron a recibir inyecciones intramusculares 5 días/semana de rh-PTH[1-34] (hormona paratiroidea recombinante humana o teriparatida, Lilly), a una dosis de 10µg/kg/día durante 10 semanas (Grupo OPOA+PTH, n=10). La PTH[1-34] fue disuelta en suero salino, a un pH de 4,5 (ajustado con ácido acético diluido). Las demás conejas recibieron inyecciones intramusculares de suero salino (Grupo OPOA+VEH, n=10). Hembras de la misma edad y peso a las que no se realizó ningún tipo de intervención fueron mantenidas en las mismas condiciones como grupo control (Grupo Sano, n=10).

Terminados los experimentos, los animales fueron sacrificados en la semana 22 mediante la administración intracardiaca de pentobarbital sódico (50 mg/kg) (Pentotal, Abbott, Madrid), previa anestesia.

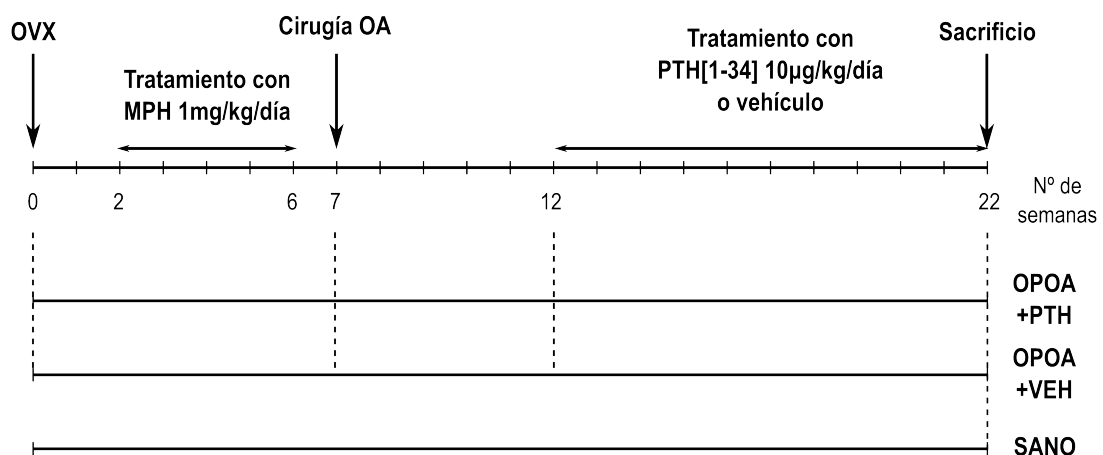


Figura 9. Esquema de desarrollo del modelo de artrosis agravada por osteoporosis (OPOA) en conejas.

Tras el sacrificio se procedió a la extracción y procesamiento de las membranas sinoviales para su análisis. Se recogieron las membranas sinoviales subpatelares de la articulación izquierda, y fueron divididas en dos partes similares para estudios histológicos y estudios de expresión génica y proteica.

### **3. Estudios histológicos**

#### **3.1. Procesado de las muestras**

Las membranas sinoviales de estos animales fueron fijadas en paraformaldehído 4% durante 24h y a continuación incluidas en parafina en vista transversal para poder identificar en las secciones tanto la cara interna como la externa del tejido.

Las muestras de cartílago, junto con el hueso subcondral, procedentes de pacientes con OA fueron fijados en paraformaldehído 4% durante 24h, y posteriormente descalcificados durante 4-5 semanas en una solución de 10% de ácido fórmico y 5% de formaldehído al 37%. A continuación, fueron incluidos en parafina en vista sagital.

#### **3.2. Valoración de la sinovitis**

Tras desparafinar y rehidratar, secciones de 5µm de la membrana sinovial de los conejos se tiñeron con hematoxilina y eosina para valorar la inflamación sinovial según la escala publicada por Krenn y colaboradores [107]. Esta escala valora la hiperplasia de la capa íntima, las alteraciones fibrovasculares y el infiltrado inflamatorio del tejido mediante puntuación de 0 a 3, donde 0 indica ausencia, siendo la puntuación total máxima de 9.

#### **3.3. Estudios de inmunohistoquímica**

La presencia de fibrosis en las membranas sinoviales de los conejos sanos, OPOA+VEH y OPOA+PTH fue analizada mediante estudios de inmunohistoquímica con un anticuerpo monoclonal anti-COL1 (Abcam, Cambridge, Reino Unido).

La presencia de los receptores de estrógenos se estudió en muestras de cartílago humano OA utilizando los anticuerpos anti-ER $\alpha$  (MC-20) y anti-ER $\beta$  (H-150) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU).

Todos los tejidos se cortaron en secciones de 5µm, que fueron desparafinadas y rehidratadas. La peroxidasa endógena fue inhibida mediante incubación durante 30min con una solución 1:1 de 3% de peróxido de hidrógeno y metanol. Tras un proceso de

recuperación antigénica por digestión con tripsina 15min a 37°C (0,1% de tripsina en 0,1% de cloruro cálcico, pH7), se realizó la incubación con los distintos anticuerpos primarios.

A continuación se realizó la incubación con un anticuerpo biotinilado anti-IgG de ratón en el caso de los conejos y un anticuerpo biotinilado anti-IgG de conejo en el caso de los humanos (Amersham, Arlington Heights, IL, EEUU), y se detectaron mediante revelado del complejo avidina/biotina unido a enzima peroxidasa (ABC), usando como cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Dako, Camarillo, CA, EEUU).

Las preparaciones fueron finalmente contrastadas con hematoxilina y montadas utilizando DPX (VWR International Ltd, Poole, Reino Unido).

## **4. Cultivos celulares**

### **4.1. Mantenimiento y diferenciación de la línea celular ATDC5**

La línea embrionaria ATDC5 es una línea condrogénica de ratón que fue aislada en 1990 a partir de un cultivo de un teratocarcinoma, el cual presentaba características fenotípicas fibroblásticas durante su fase de crecimiento [9]. Esta línea, en presencia de insulina (a una concentración de 10µg/ml), es capaz de crecer más allá de la confluencia y diferenciarse a condrocitos, con producción de proteoglicanos y COL2. Esta línea es, por tanto, un modelo óptimo para el estudio de los procesos fisiológicos y fisiopatológicos del cartílago.

Las células fueron adquiridas al banco de células RIKEN Cell Bank (Ibaraki, Japón). Para su mantenimiento, las células se cultivaron en medio DMEM-Hams F12 suplementado con el 5% de Suero Fetal Bovino (FBS) y antibióticos (100U/ml penicilina y estreptomicina), todos adquiridos en Lonza (Walkersville, MD, EEUU), con un suplemento de 10µg/ml de transferrina (Sigma, Saint Louis, MO, USA) y  $3 \times 10^{-8}$ M de selenito sódico (Sigma, Saint Louis, MO, USA), a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

Para sucesivos pases y mantenimiento en cultivo, las células se despegaron una vez alcanzado el 80% de confluencia, aproximadamente cada 2-3 días. Para ello se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con 3 ml de Tampón Fosfato Salino 1X (PBS, Lonza, Walkersville, MD, EEUU) y se despegaron usando 1 ml de Tripsina/0.5% EDTA (Lonza, Walkersville, MD, EEUU) por cada placa petri. Las células se incubaron 5min a

37°C, se resuspendieron en medio con suero y se sembraron a una densidad de  $3 \times 10^5$  células por placa petri.

Para inducir la diferenciación condrocitaria, las células se sembraron a una densidad de 6500 células/cm<sup>2</sup> y se cultivaron con medio de crecimiento suplementado con 10µg/ml de insulina (Humulina, Lilly, Alcobendas, España).

#### **4.2. Mantenimiento y diferenciación de la línea celular MC3T3-E1**

La línea celular MC3T3-E1 es una línea de células procedentes de calvaria de ratón con capacidad osteogénica, que produce una deposición mineral similar a la que ocurre *in vivo* y sufre diferenciación hasta osteocito tras su cultivo durante 40-50 días [195].

Estas células fueron donadas por el laboratorio del Dr. Pedro Esbrit (IIS Fundación Jiménez Díaz, Madrid). Para su mantenimiento, las células fueron cultivadas en medio alfa-MEM suplementado con el 10% de FBS inactivado por calor (30min a 56°C) y antibióticos (100U/ml penicilina y estreptomicina).

Cuando las células alcanzaron el 90% de confluencia, se realizaron pases 1:3. Para ello, se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con 3 ml de PBS y se despegaron usando 1 ml de Tripsina/0.5% EDTA por cada placa petri. Las células se incubaron 5min a 37°C, se resuspendieron en medio con suero y se sembraron en nuevas placas.

A pesar de que estas células sufren diferenciación osteoblástica con el tiempo de cultivo, el proceso de síntesis y mineralización de la matriz es favorecido por la adición al medio de cultivo de ácido ascórbico y β-glicerol fosfato [151]. Por tanto, para los estudios con células diferenciadas, las MC3T3 se sembraron a una densidad de 25000 células/cm<sup>2</sup> y se cultivaron en dicho medio suplementado con 50µg/ml de ácido L-ascórbico y 10mM β-glicerol fosfato (Sigma, Saint Louis, MO, EEUU) el tiempo correspondiente.

#### **4.3. Aislamiento y cultivo primario de condrocitos humanos**

Los condrocitos utilizados para los estudios *in vitro* se obtuvieron del cartílago articular de los cóndilos femorales y del plato tibial procedente de los pacientes con OA, y se cultivaron en medio DMEM suplementado con el 10% de FBS y antibióticos (100U/ml penicilina y estreptomicina).

Las células se aislaron por digestión secuencial del cartílago con Tripsina/0.5%

EDTA durante 15 minutos a 37 °C en agitación y posteriormente 1g/l de colagenasa tipo IV (Sigma, Saint Louis, MO, EEUU) durante 6 horas a 37 °C en agitación. Tras centrifugar 5min a 500g, las células se resuspendieron en medio completo de cultivo, se sembraron en placas de petri y se incubaron a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>.

Para los estudios de expresión de aromatasa, las células se contaron con azul tripán y se sembraron 3x10<sup>5</sup> células/pocillo en placas P6, cultivándose a distintos tiempos o hasta confluencia en medio DMEM sin rojo fenol con 10% de FBS tratado con carbón vegetal. Para el resto de experimentos, las células se expandieron en dos pases 1:3 con tripsina siguiendo el protocolo indicado para las líneas celulares, utilizándose para los estudios en el segundo pase.

#### **4.4. Aislamiento y cultivo primario de osteoblastos humanos**

Los osteoblastos utilizados para los estudios *in vitro* se obtuvieron del hueso trabecular de los cóndilos femorales y del plato tibial procedente de los pacientes con OA, y se cultivaron en medio DMEM suplementado con el 20% de FBS inactivado por calor (30min a 56°C) y antibióticos (100U/ml penicilina y estreptomicina).

Bajo condiciones asépticas, se recogieron 6-8 fragmentos de hueso trabecular de 0,5mm de diámetro utilizando un sacabocados de biopsias y se colocaron en una placa petri equidistantes, con medio de cultivo completo. Cuando las células alcanzaron la confluencia, se retiraron los fragmentos de hueso y las células se tripsinizaron según el protocolo anteriormente expuesto y se sembraron en frascos de cultivo de 75cm<sup>2</sup>. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días, y al llegar a confluencia se realizaron pases 1:3. Todos los experimentos se realizaron con osteoblastos en los pases 3-4.

### **5. Transfección celular**

Las células MC3T3 fueron transfectadas para la sobreexpresión de la LCN2 utilizando el plásmido comercial pCMV6-LCN2-GFP (OriGene Technologies Inc., MD, EEUU). Como control, otro grupo de células fueron transfectadas con el plásmido vector del gen (pCMV6-AC-GFP).

La transfección se realizó utilizando el reactivo X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche Applied Science, Alemania). Se sembraron las células en



placas de 6 pocillos a una densidad de  $2 \times 10^5$  células por pocillo y se dejaron crecer 24h. A continuación, el medio de cultivo se reemplazó por medio sin FBS y se realizó la transfección utilizando una mezcla de 3 $\mu$ l de reactivo y 1 $\mu$ g de plásmido diluidos en 100 $\mu$ l de medio por cada pocillo.

Después de 24h, el medio de la transfección fue reemplazado por medio normal de crecimiento. Las células se dejaron crecer durante 24h y posteriormente se recogió el medio condicionado enriquecido en LCN2, se esterilizó con filtros de 0,2 $\mu$ m y se guardó a -20°C hasta su utilización. Las células fueron lisadas con 500 $\mu$ l de reactivo Tripure (Roche, IN, EEUU) para el aislamiento del ARN.

## **6. Aislamiento y caracterización de derivados del jengibre**

Todos los trabajos de aislamiento, síntesis y caracterización de los compuestos químicos derivados del jengibre fueron realizados en el Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Federal de São Carlos por el Dr. Jame's A. da Silva y el Dr. Paulo Cezar Vieira.

Se realizó un extracto de jengibre con etanol y se separaron subfracciones enriquecidas en la forma hidratada del 6-shogaol en columnas de fase reversa utilizando HPLC de escala semi-preparativa. Este compuesto se hizo reaccionar con 2,4-dinitrofenilhidrazina para sintetizar el SSi6.

## **7. Obtención de medios condicionados**

Los osteoblastos y condrocitos humanos fueron sembrados en placas de 6 pocillos y dejados crecer hasta confluencia. Tras ser privados de suero (o cultivados con 1% FBS inactivado por calor en el caso de los osteoblastos) durante 18h, las células fueron estimuladas con 10 $\mu$ M de Dx o 1ng/ml de IL-1 $\beta$  durante 24h. Tras 3 lavados con medio de cultivo sin suero, se permitió condicionar nuevo medio de cultivo durante 24h más en ausencia de estímulos. El medio condicionado se recogió, se esterilizó con filtros de 0,2 $\mu$ m y se guardó a -20°C hasta su utilización.

## **8. Estudio de la viabilidad celular**

La viabilidad celular se estudió mediante ensayo de MTT, que permite estudiar la actividad metabólica de las células dentro del cultivo, pudiendo ser utilizada para detectar

citotoxicidad, proliferación y activación celular [134]. Esta técnica utiliza el 3(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, Saint Louis, MO, EEUU), que es metabolizado por enzimas deshidrogenasas mitocondriales y da lugar a la formación de una sal de formazán con absorbancia a una longitud de onda de 540-570nm.

Los estudios se realizaron sembrando 8000 células en placas de 96 pocillos. Tras privación de suero durante 18h, las células fueron estimuladas con los tratamientos adecuados. Cuatro horas antes de que se cumpliera el tiempo del tratamiento se añadió el compuesto MTT, a una concentración final de 0,5 mg/ml y se incubó a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>. Al final del tratamiento, se añadieron 100 µl de una solución SDS 10% y 0,01M de ácido clorhídrico, que detuvo la reacción enzimática y facilitó la solubilización de la sal de formazán. La placa se incubó durante toda la noche a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> para permitir la completa disolución de los cristales y después, se realizó la lectura de la placa a una longitud de onda de 570nm, aplicando la corrección de la absorbancia a 620nm.

El resultado de restar la absorbancia a 620nm a la de 570nm se correlacionó directamente con la actividad metabólica de las células.

## 9. Cuantificación de nitritos

La valoración de la producción de óxido nítrico se realizó mediante la medida de la acumulación de nitritos en el medio de cultivo. Para ello se utilizó la técnica de Griess, basada en la reacción de diazotación de Griess, para la detección por colorimetría de la producción de nitritos orgánicos [77]. En este proceso, el ácido sulfanílico reacciona en solución ácida con los nitritos para convertirse en una sal de diazonio, que entonces se une a N-(1-naftiletil)endiamina, formando un colorante que absorbe la luz a 540nm.

Para este ensayo, se recogieron 50µl de medio de cultivo de cada condición por duplicado, y se depositaron en placas de 96 pocillos. El reactivo de Griess se preparó mezclando en proporción 1:1 los reactivos A (5% (m/v) de ácido fosfórico + 1% (m/v) de sulfanilamida) y B (0,1% (m/v) de N-(1-naftiletil)endiamina). 50µl del reactivo se mezclaron con el medio de cultivo y, tras 5min de incubación a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 540nm.

Al mismo tiempo se midió la absorbancia de una recta patrón de 0,0625-10µg/ml de nitrito sódico para determinar la concentración de nitritos presente en los medios de cultivo.

## **10. ELISA**

La actividad de la enzima aromatasa se evaluó mediante la medida por ELISA de la producción de estradiol a partir de testosterona.

Los condrocitos fueron cultivados hasta alcanzar confluencia. Para evitar interferencias en el metabolismo estrogénico de las células, se utilizó medio de cultivo sin rojo fenol (por su actividad estrogénica [17]) con FBS tratado con carbón vegetal para eliminar las hormonas presentes. Después de 18h sin suero, las células se incubaron con 100ng/ml de testosterona (Sigma, Saint Louis, MO, EEUU) durante 8 o 24h, y se recogieron los medios de cultivo para cuantificar la presencia de estradiol utilizando el kit de ELISA Estradiol Sensitive (DRG International, Alemania) según las instrucciones del fabricante.

## **11. Estudio de la mineralización**

La capacidad de mineralización de las células MC3T3-E1 durante su diferenciación se estudió mediante una tinción con rojo de alizarina, un colorante con capacidad de formar precipitados tras unirse a calcio.

Para ello, las células fueron fijadas durante 5min a -20°C con 70% de etanol. A continuación, las placas se incubaron con 40mM de rojo de alizarina a pH4,2 durante 30min en agitación. Finalmente, el exceso de colorante se retiró con exhaustivos lavados con agua destilada hasta la eliminación de la tinción inespecífica..

## **12. Aislamiento del ARN**

La extracción del ARN de los cultivos celulares y los tejidos se llevó a cabo utilizando el reactivo de TriPure (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). En algunos casos el kit Nucleospin RNA/Protein (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) fue utilizado para la extracción del ARN y las proteínas de los mismos experimentos.

Los experimentos se llevaron a cabo en placas de 6 pocillos. Los osteoblastos y condrocitos humanos fueron sembrados y dejados crecer hasta alcanzar confluencia. Las

células ATDC5 se sembraron a una densidad de  $2,5 \times 10^5$  células en cada pocillo, y las células MC3T3 a  $3 \times 10^5$  por pocillo. Después de privar de suero a las células durante 18h, fueron tratadas con los diferentes estímulos durante el tiempo correspondiente. Al final del experimento, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con PBS 1x. Las células fueron lisadas directamente en la placa de cultivo añadiendo 500µl de reactivo de TriPure o 350µl de reactivo RP1 en cada pocillo. El lisado obtenido se transfirió a tubos de microcentrífuga de 1,5ml para proceder al aislamiento del ARN según las instrucciones del fabricante.

En el caso de los tejidos, éstos fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido tras su recogida y conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Los tejidos fueron triturados mecánicamente, mantenidos durante todo el proceso en nitrógeno líquido. El polvo fue mezclado con 1ml de TriPure y, tras cetrifugar para eliminar los restos de tejido, el lisado fue procesado para el aislamiento del ARN del mismo modo que en el caso anterior.

La calidad (ratio de absorbancia 260/280 y 260/230) y la concentración del ARN aislado fueron determinadas utilizando el espectrofotómetro Nanodrop ND1000 (NanoDrop, Wilmington, EEUU).

### **13. Estudios de expresión génica**

#### **13.1. Retrotranscripción**

La retrotranscripción (RT) se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante con el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, CA, EEUU). Se utilizaron 1,5µg de ARN total en un volumen final de 20µl, y se utilizó un inhibidor de ribonucleasas (RNasin, Promega, WI, EEUU) para evitar la degradación del ARN. La reacción se llevó a cabo en el equipo StepOne Plus (Applied Biosystems, CA, EEUU) según el perfil térmico siguiente: 10min  $25^{\circ}\text{C}$ , 2h  $37^{\circ}\text{C}$ , 5min  $85^{\circ}\text{C}$ . Una vez finalizada la RT, el ADNc obtenido fue conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **13.2. PCR a tiempo real**

La reacción de PCR (*polimerase chain reaction*) se realizó con el sistema *TaqMan* (Applied Biosystems, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las

reacciones se realizaron en duplicado o triplicado y se incluyeron controles negativos de amplificación en los que no se introdujo ADNc, para confirmar la ausencia de contaminación de los reactivos. La mezcla de reacción estuvo compuesta por los siguientes reactivos:

- 10µl de *TaqMan Master mix*
- 1µl de sonda + cebadores (*TaqMan gene expression assays*, ver Tabla 1)
- 8µl de agua de PCR
- 1µl de ADNc

En algunos casos se utilizó el sistema *SYBR Green* (Applied Biosystems, CA, EEUU) y se utilizaron cebadores diseñados específicamente (Tabla 2) u otros comerciales en el caso de muestras humanas (Sigma, MO, EEUU) (Tabla 1). Las concentraciones de cebadores a utilizar y la concentración de muestra de ADNc fueron optimizadas para obtener eficiencias próximas al 100% y evitar la formación de dímeros de cebadores. En todos los casos se comprobó la ausencia de amplificación de otros fragmentos de PCR diferentes al esperado mediante una curva de disociación y electroforesis en geles de agarosa. Las reacciones se llevaron a cabo en duplicado o triplicado y, además del control de reactivos, se realizó un control de PCR con muestras de en las que no se añadió la enzima retro-transcriptasa durante la retrotranscripción, para determinar si existía contaminación del ARN con ADN genómico.

Todas las reacciones se realizaron con el mismo programa de PCR, que consistió en: 1 ciclo de 2min a 50°C y 10 minutos a 95°C; 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60°C. En el caso del sistema *SYBR Green*, tras el último ciclo de PCR se realizó una curva de disociación: 1 min a 95°C, 30 segundos a 55°C y un ascenso de temperatura gradual con monitorización de fluorescencia hasta 95°C.

Tabla 1. Relación de ensayos comerciales para la cuantificación de la expresión génica.

Gen	Especie	Identificador	Símbolo	Identificador del ensayo	Sistema utilizado	Casa Comercial
Colágeno de tipo II	Humano	NM_033150	COL2A1	H_COL2A1_1	<i>SYBR Green</i>	<i>Sigma</i>
Agrecano	Humano	NM_001135	ACAN	H_ACAN_1	<i>SYBR Green</i>	<i>Sigma</i>
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Humano	NM_002046	GAPDH	H_GAPDH_1	<i>SYBR Green</i>	<i>Sigma</i>
Lipocalina 2	Humano	NM_005564	LCN2	Hs01008571_m1	<i>TaqMan</i>	<i>Applied Biosystems</i>
Aromatasa	Humano	NM_031226 NM_000103	CYP19A1	Hs00903411_m1	<i>TaqMan</i>	<i>Applied Biosystems</i>
Hipoxantina fosforribosiltransferasa 1	Humano	NM_000194	HPRT1	Hs99999909_m1	<i>TaqMan</i>	<i>Applied Biosystems</i>
Lipocalina 2	Ratón	NM_008491	LCN2	Mm01324470_m1	<i>TaqMan</i>	<i>Applied Biosystems</i>
Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa	Ratón	NM_013556	HPRT	Mm00446968_m1	<i>TaqMan</i>	<i>Applied Biosystems</i>
IL-1b	Conejo	NM_001082201	IL1B	<i>Ensayo personalizado</i>	<i>TaqMan</i>	<i>Applied Biosystems</i>
Ciclooxigenasa 2	Conejo	NM_001082388	COX2	<i>Ensayo personalizado</i>	<i>TaqMan</i>	<i>Applied Biosystems</i>
Colágeno tipo I, alfa 1	Conejo	AY633663	COL1A1	Oc03396074_g1	<i>TaqMan</i>	<i>Applied Biosystems</i>
Metaloproteasa de matriz 9	Conejo	NM_001082203	MMP9	<i>Ensayo personalizado</i>	<i>TaqMan</i>	<i>Applied Biosystems</i>
Metaloproteasa de matriz 13	Conejo	NM_001082037	MMP13	Oc03396895_m1	<i>TaqMan</i>	<i>Applied Biosystems</i>
Proteína quimioatrayente de monocitos 1	Conejo	NM_001082294	MCP-1	<i>Ensayo personalizado</i>	<i>TaqMan</i>	<i>Applied Biosystems</i>
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Conejo	NM_001082253	GAPDH	Oc03823402_g1	<i>TaqMan</i>	<i>Applied Biosystems</i>

Tabla 2. Relación de cebadores diseñados para la cuantificación de la expresión génica con el sistema SYBR Green.

Gen	Especie	Identificador de la secuencia	Símbolo	Secuencia de cebadores
Interleucina 6	Ratón	NM_031168	IL6	S: ACAACCACGGCCTTCCCTACTT AS: CACGATTTCCTCCAGAGAACATGTG
Proteína quimioatrayente de monocitos 1	Ratón	NM_011333	MCP1	S: CCACTCACCTGCTGCTACTCAT AS: TGGTGATCCTCTTGCTAGCCCTCC
$\beta$ -actina	Ratón	NM_007393	ACTB	S: AGGTCATCACTATTGGCAACGA AS: CACTTCATGATGGAATTGAATGTAGTT

### 13.3. Cuantificación relativa

El análisis de la expresión génica se realizó con el programa StepOne Plus (Applied Biosystems, CA, EEUU) mediante el sistema de cuantificación relativa. En todos los casos, una muestra fue considerada control y se le asignó una expresión de 1, mientras que el resto de cuantificaciones se expresaron en relación a este calibrador.

Por cada ADNc se realizaron varias amplificaciones diferentes, una para el o los genes de interés y otra para el gen normalizador (gen que no varía su expresión en función de los tratamientos y que se utiliza como control de carga). Además por cada reacción de PCR, también se realizó un control de fluorescencia inicial monitorizando la fluorescencia emitida por el colorante ROX, que es utilizado por el programa para corregir variaciones entre las diferentes reacciones. De este modo se garantizó que las variaciones de expresión observadas eran debidas a los tratamientos y no a diferencias de carga.

El método utilizado por el programa para la cuantificación relativa es conocido como el método  $\Delta\Delta C_p$ , donde  $C_t$  es el ciclo a partir del cual la amplificación empieza a ser estadísticamente significativa por encima del ruido de fondo. Debido a la inversa relación entre el  $C_t$  y la cantidad inicial de ADNc y teniendo en cuenta que en cada ciclo de PCR se duplican las copias se puede representar el nivel de expresión de un gen (L) como:

$$L = 2^{-C_t}$$

Para compensar las diferencias de carga se normaliza el nivel de expresión del gen de interés (GI) dividiendo entre la expresión del gen normalizador (GN). Esto se puede representar:

$$\frac{2^{-C_i(GI)}}{2^{-C_i(GN)}} = 2^{-[C_i(GI) - C_i(GN)]} = 2^{-\Delta C_i}$$

Una vez normalizada la expresión del gen de interés se hace la cuantificación relativa con respecto al calibrador. De esta forma se determina el número de veces que varía la expresión del gen de interés de una muestra respecto al control (calibrador). Para ello, se divide la expresión normalizada del gen de interés en la muestra (exp) entre la expresión del gen de interés en el control (cont). Esto se puede representar como:

$$\frac{2^{-\Delta C_i(\text{exp})}}{2^{-\Delta C_i(\text{cont})}} = 2^{-(\Delta C_i(\text{exp}) - \Delta C_i(\text{cont}))} = 2^{-\Delta \Delta C_i}$$

#### 14. Aislamiento de proteínas

La extracción de proteínas de los cultivos celulares se llevó a cabo en unos casos utilizando el kit Nucleospin RNA/Protein (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante y en otros mediante un tampón de lisis para extracción de proteínas (50mM tampón Tris pH7,5 + 5mM EDTA + 250mM NaCl + 30mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + 10%(v/v) tritón X-100 + 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> + 100mM NaF + 1:1000 PMSF + 1:1000 aprotinina + 1:100 de cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma, MO, EEUU)). En el segundo caso, tras disgregar las células en dicho tampón, se agitaron en un vortex y se incubaron 10-15min en hielo. Finalmente, se centrifugaron a 12000rpm durante 15min a 4°C y se recogió el sobrenadante conteniendo las proteínas.

La concentración de proteína se determinó mediante el ensayo del ácido bicinconínico (BCA) o el kit Protein Quantification Assay de Macherey-Nagel (Düren, Alemania) según corresponda.

#### 15. Estudios de expresión proteica

Para analizar la expresión de proteínas, se realizaron ensayos de *western blot*. La misma cantidad de cada muestra de proteínas se separó en geles de acrilamida con dos fases: una superior (gel concentrante) al 4% y una inferior (gel separador) al 10%.

La electroforesis se realizó empleando como tampón de migración el formado por Tris Base, Glicina y SDS al 10%. Una vez separadas las proteínas, éstas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) previamente hidratada en metanol y



agua. La transferencia se realizó empleando un aparato de transferencia semi-seca Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BioRad) durante 1h a 20V.

Una vez completada la transferencia, las membranas fueron bloqueadas usando como tampón de bloqueo una solución al 5% de leche en TBS-T (NaCl 150mM; Tris 20mM, pH 7.6; Tween 0.1%) durante 1h a temperatura ambiente. A continuación fueron incubadas con el anticuerpo primario pertinente durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos utilizados fueron anti-MyD88 y anti-NOS2 (Santa Cruz Biotechnology, CA, EEUU), anti-fosfo-ERK1/2 y anti-ERK1/2 (Cell Signaling, MA, EEUU) y anti-LCN2 (R&D Systems, MN, EEUU). Pasado el tiempo de incubación, las membranas se lavaron en TBS-T tres veces durante 10 minutos, a temperatura ambiente y en agitación continua. Después se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 hora, a temperatura ambiente y agitación continua, en tampón de bloqueo a una dilución 1:5000. Transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo secundario, la membrana se lavó en TBS-T (3 lavados, 10 minutos cada uno) y, posteriormente, se reveló con Immobilon Detection kit (Millipore, MA, EEUU). La quimioluminiscencia fue detectada utilizando el equipo ImageQuant 4000 (GE Healthcare). Por último, las membranas fueron lavadas con una solución de glicina con pH2 durante 1h a temperatura ambiente para eliminar las uniones de los anticuerpos utilizados. Después se incubaron las membranas de nuevo con un anticuerpo primario para detectar la expresión de actina (Sigma-Aldrich, MO, EEUU), con el objetivo de confirmar la homogeneidad de las cargas. De esta forma, la expresión de las proteínas de interés fue normalizada por la expresión de actina.

Las imágenes fueron cuantificadas utilizando el programa ImageJ (ImageJ v1.45s, NIH, EEUU).

## **16. Estudios de actividad de catepsina K**

Los estudios de cinética enzimática y las constantes de disociación de los inhibidores fueron realizados en el Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Federal de São Carlos por el Dr. Jame's A. da Silva y el Dr. Paulo Cezar Vieira. Para ello se realizaron ensayos de hidrólisis de un sustrato fluorogénico en tiempo real.

Los estudios de inhibición de la actividad catepsina K de los compuestos derivados del jengibre en condrocitos humanos se realizaron mediante la incubación de las células

con el sustrato fluorogénico de la catepsina K Cbz-Gly-Pro-Arg-M $\beta$ NA (solución de acetato pH5,5 + 1mM Cbz-Gly-Pro-Arg-M $\beta$ NA + 500 $\mu$ M 5-nitrosalicilaldehído + 1mM DTT + 2,7mM L-cisteína + 0,25mM EDTA) en presencia de los inhibidores. La presencia de cristales fluorescentes fue analizada con un microscopio Leica SP5 (longitud de onda de excitación de 488nm y de emisión de 520-530nm).

## 17. Zimografía

La actividad gelatinasa (MMP-2 y MMP-9) fue analizada mediante la técnica de zimografía en geles de acrilamida al 10% conteniendo 0,1% de gelatina. El medio de cultivo condicionado por las distintas células fue recogido y los restos celulares se eliminaron con filtros de 0,2 $\mu$ m. Además, el medio de cultivo de las células MC3T3 fue incubado con 36ng/ml de LCN2 recombinante de ratón (R&D Systems, MN, EEUU) durante 1h a 37°C para permitir la formación de los complejos MMP-9/LCN2.

Las proteínas de los distintos medios se separaron mediante electroforesis bajo condiciones no reductoras a 4°C. Después, los geles se lavaron con 2,5%(v/v) de Tritón X-100 y se incubaron con tampón de proteólisis (50mM Tris-HCl pH7.6, 0.2mM NaCl, y 5mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2% Nonidet P-40 y 0.01% Tween 20) durante 20h a 37°C. Por último, los geles fueron incubados con solución de tinción (0.05% de azul Coomassie, 50% de metanol, 10% de ácido acético) durante 1h a temperatura ambiente y posteriormente desteñidos con una solución de 4% de metanol y 8% de ácido acético. Los geles se escanearon usando el equipo Gel Doc EZ (Bio-Rad Laboratories, Inc) y se analizaron con el programa ImageJ (ImageJ v1.45s, NIH, EEUU).

## 18. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en este trabajo se expresaron como las medias  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) de al menos tres experimentos independientes, y fueron analizados mediante el programa estadístico GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.). Para ello se utilizaron el test t de Student o el análisis de la varianza seguido del test de Bonferoni para comparaciones múltiples, o sus correspondientes pruebas no paramétricas Mann-Whitney y Kruskal-Wallis seguido por el test de Dunn para comparaciones múltiples, según corresponda. Un valor p inferior a 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

## **IV. RESULTADOS**

## **1. Estudio de la síntesis local de estrógenos en el cartílago**

La aromatasa es la principal enzima responsable de la producción de estrógenos, mediante la conversión de testosterona a estradiol y de androstenediona a estrona. Tras la menopausia, cuando la producción sistémica de estrógenos se ve drásticamente reducida, esta enzima adquiere un papel fundamental en el mantenimiento de los niveles locales de estrógenos en diferentes tejidos. Debido a la reducida información existente sobre su presencia en el cartílago, decidimos realizar un estudio para determinar su relevancia y posible modulación farmacológica en la homeostasis del cartílago articular humano de mujeres postmenopáusicas con OA.

### **1.1. Los condrocitos humanos expresan una aromatasa funcional en cultivo**

Para estudiar la expresión de aromatasa en los condrocitos humanos, las células recién aisladas fueron cultivadas en monocapa hasta alcanzar la confluencia en medio sin rojo fenol y con FBS tratado con carbón vegetal para eliminar la posible influencia del efecto estrogénico del rojo fenol y de los esteroides presentes en el FBS. Tras 18h en ausencia de FBS, las células fueron tratadas con 100ng/ml de testosterona para estudiar su conversión a estradiol por la enzima aromatasa.

Tanto a 8h como a 24h de incubación, los condrocitos fueron capaces de producir cantidades significativas de estradiol (Figura 10A), demostrando la presencia de una enzima aromatasa activa. Además, estas células mostraron expresión del ARNm de la aromatasa, el cuál no se vio modificado por la presencia de testosterona a los tiempos estudiados (Figura 10B).

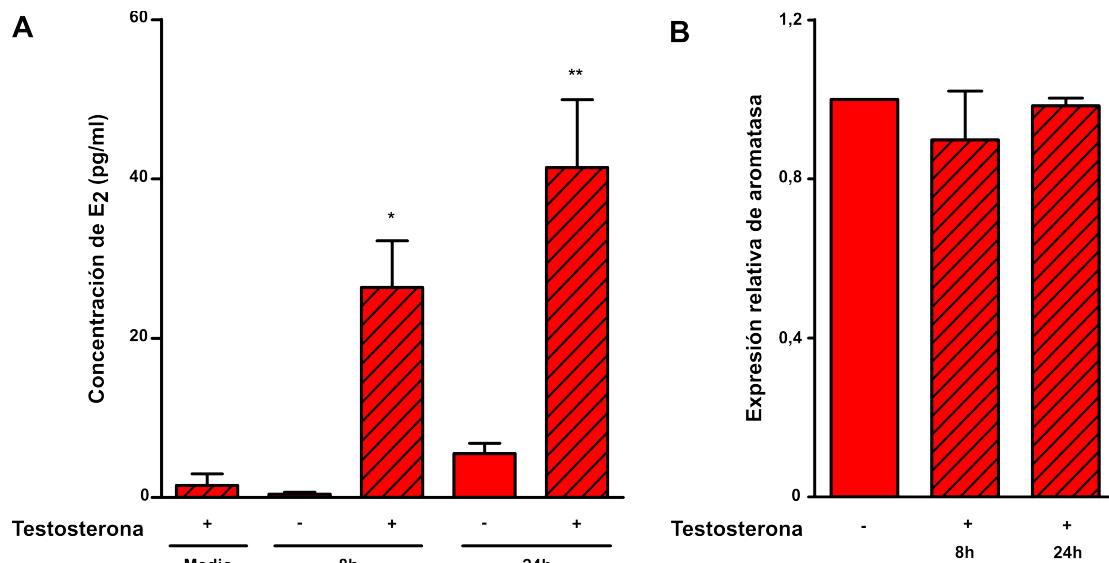


Figura 10. Estudio de la actividad y expresión de la enzima aromatasa en condrocitos cultivados. Tras privación de FBS durante 18h, las células fueron incubadas en presencia o ausencia de 100ng/ml de testosterona durante 8 y 24h. (A) Para determinar la actividad de la enzima, la concentración de estradiol (E<sub>2</sub>) se determinó mediante ELISA en el medio de cultivo. (B) La expresión de aromatasa se estudió mediante PCR a tiempo real. Datos expresados como media±error estándar de la media de al menos 4 experimentos independientes. \*p<0,05; \*\*p<0,01.

## 1.2. La expresión de aromatasa en condrocitos humanos es inducida durante el cultivo

Tras detectar la expresión y actividad de la aromatasa en los condrocitos cultivados, estudiamos su expresión en cartílago humano. Se emplearon 3 muestras de cartílago sano y 6 muestras de cartílago OA, con la finalidad de determinar si existían diferencias en la expresión entre ambos grupos. Sin embargo, la expresión en estas muestras fue prácticamente insignificante, detectándose la amplificación a ciclos de PCR muy elevados (por encima del ciclo 38 en el 66% de los pacientes). En cambio, sí que se detectó la presencia de ER $\alpha$  y ER $\beta$  en el cartílago humano mediante inmunohistoquímica como ya ha sido previamente descrito por otros autores [208] (Figura 11).

Ante estos resultados, nos planteamos estudiar la relación entre el cultivo y la expresión de aromatasa. Para ello, estudiamos la expresión de la enzima en cartílago total recogido directamente de los platos tibiales de los pacientes, en condrocitos recién aislados tras la digestión de este cartílago y en condrocitos cultivados durante 2h y 2, 7 y 15 días después del aislamiento. De esta forma, observamos que la expresión de la aromatasa se

mantuvo mínima en los condrocitos recién aislados y tras 2h de cultivo, pero a los 2 días su expresión se vio inducida y permaneció así durante el resto de tiempos analizados (Figura 12A).

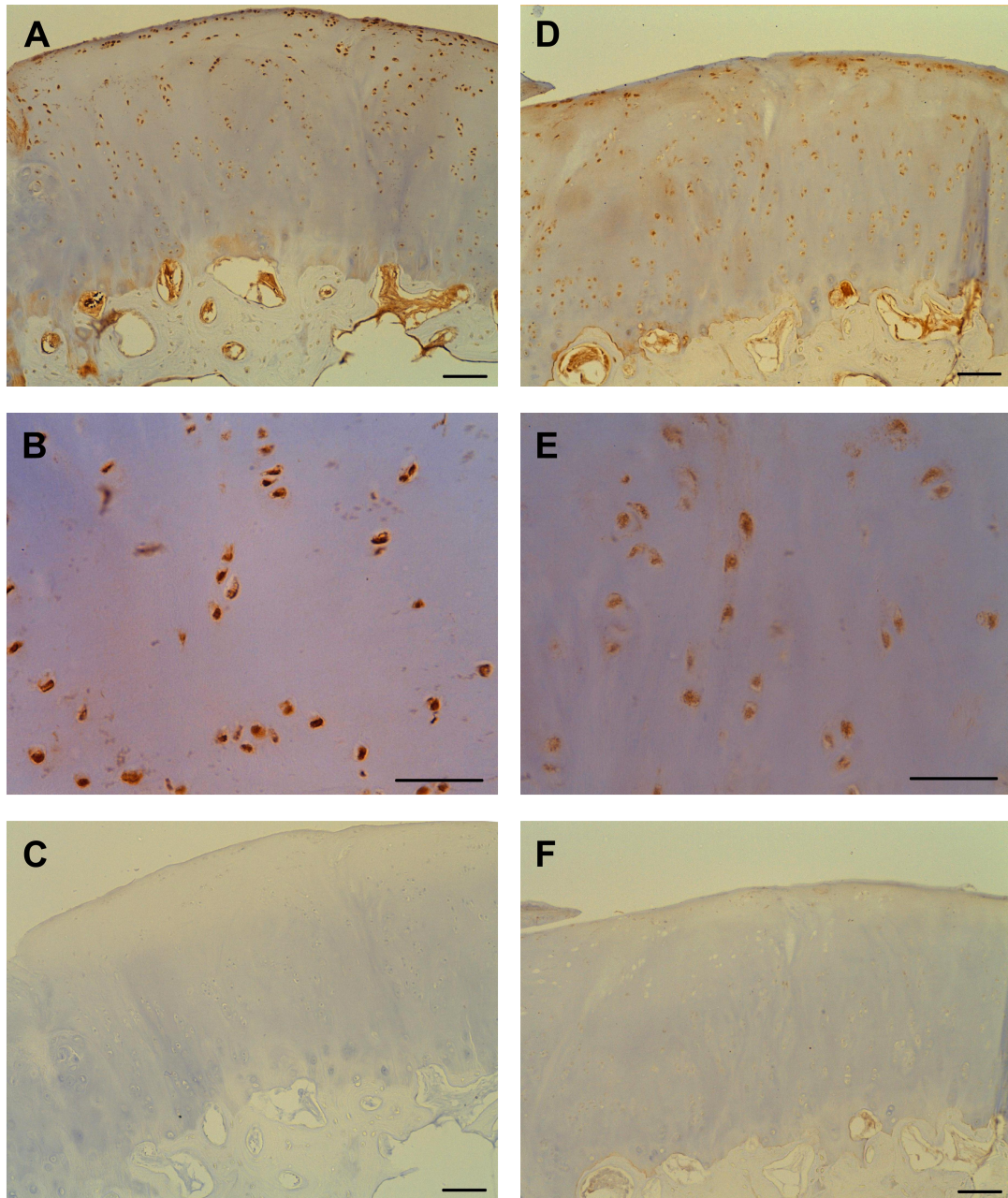


Figura 11. Estudio de la expresión de los receptores de estrógenos (ER) en cartílago articular humano OA mediante inmunohistoquímica. (A-B) Expresión del ER $\alpha$ . (D-E) Expresión de ER $\beta$ . (C, F) Controles negativos de inmunohistoquímica para ER $\alpha$  y ER $\beta$ . Escala A,D, C y F: 100 $\mu$ m; escala B y E: 50 $\mu$ m.

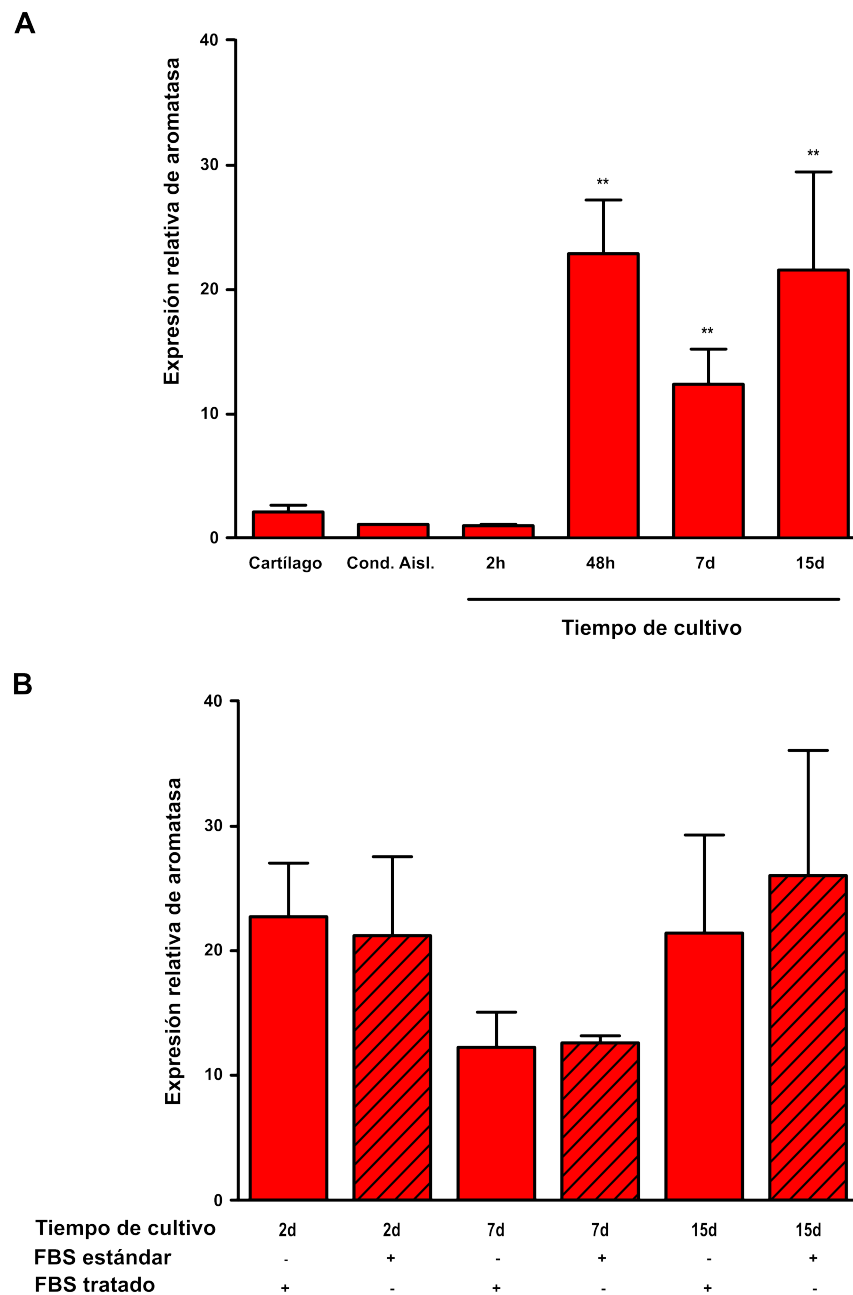


Figura 12. Estudio de la expresión de la aromatasa durante el aislamiento y el cultivo de condrocitos primarios humanos. (A) Expresión génica de la enzima aromatasa en el cartilago total, en condrocitos recién aislados (Cond. Aisl.) y en condrocitos cultivados durante 2h, 48h, 7 días y 15 días, en ausencia de hormonas esteroideas. (B) Expresión génica de la enzima aromatasa tras 2, 7 o 15 días de cultivo en presencia (FBS estándar) o ausencia (FBS tratado) de hormonas esteroideas. Datos expresados como media±error estándar de la media de al menos 4 experimentos independientes. \*\*p<0,01.

Puesto que los experimentos en cultivo fueron realizados en situación de privación estrogénica, estudiamos el efecto de las hormonas esteroideas presentes en el FBS realizando cultivos durante diferentes tiempos en presencia de FBS estándar (sin tratamiento con carbón vegetal) como suplemento al medio de cultivo. En este caso, determinamos que la presencia o no de estrógenos en el medio no estaba influyendo en la expresión de la aromatasa en estos experimentos (Figura 12B).

### **1.3. La expresión de aromatasa acompaña a la pérdida de diferenciación condrocitaria**

El cultivo de los condrocitos en monocapa está asociado a una pérdida del fenotipo condrocitario, caracterizado por la pérdida de la expresión de marcadores de madurez condrocítica como son el agrecano y el COL2 [58, 112]. Por ello, quisimos estudiar si esta pérdida de fenotipo estaba relacionada con la expresión de la aromatasa.

Los estudios de expresión génica mostraron que tanto la expresión del COL2 como la del agrecano se vieron reducidas en los mismos tiempos de cultivo en los que la expresión de aromatasa se inducía (Figura 13). De hecho, la expresión de aromatasa presentó una correlación negativa con la expresión del COL2 (agrecano:  $r=-0.5455$ ,  $p=0.0876$ ; COL2:  $r=-0.6455$ ,  $p=0.0368$ ).

Pese a la correlación de la expresión de la aromatasa con este proceso de desdiferenciación, el cultivo de los condrocitos en esferas de alginato para inducir una rediferenciación de las células no logró restituir la expresión de la aromatasa a los bajos niveles encontrados en el cartílago. Sin embargo, sí se logró un aumento de la expresión del agrecano y del COL2 de 4 y 25 veces respectivamente (datos no mostrados).



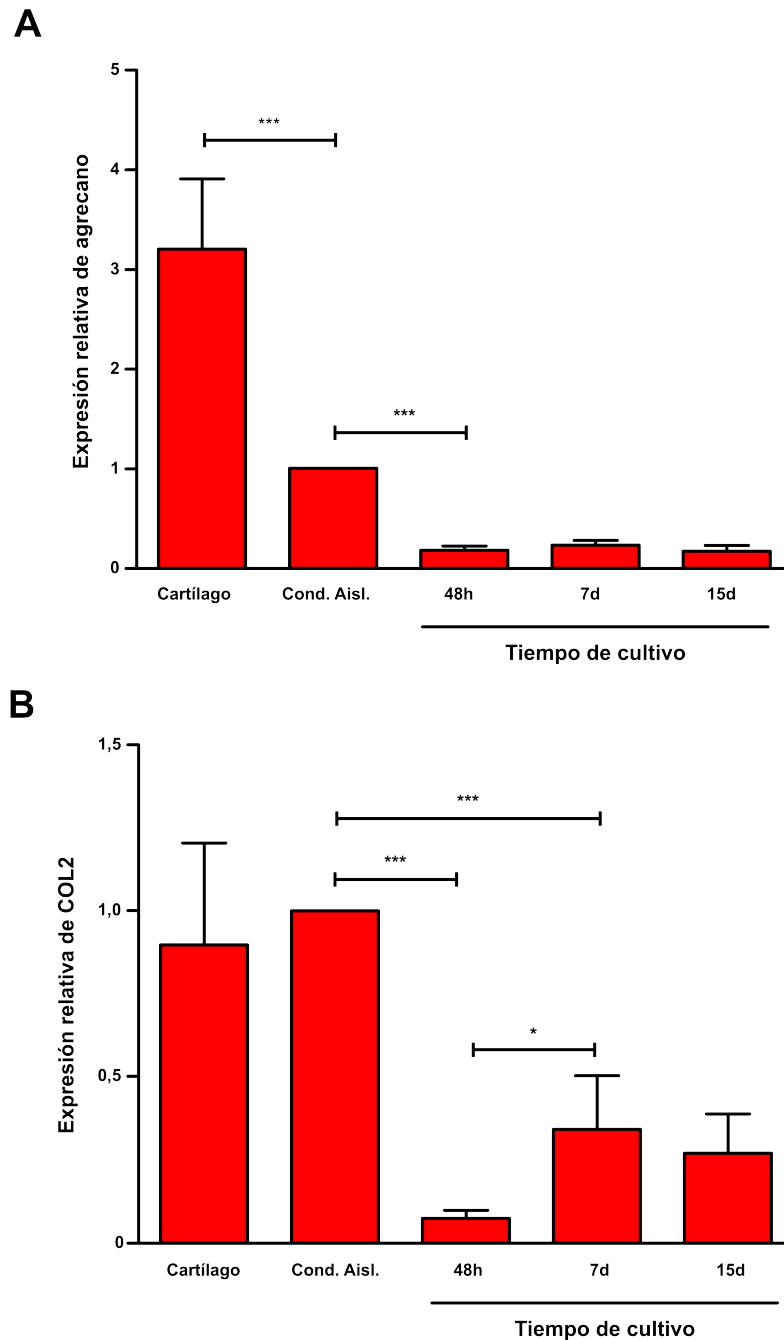


Figura 13. Estudio de marcadores de diferenciación condrocitaria durante el aislamiento y el cultivo de condrocitos. (A) Expresión génica del agrecano en el cartílago total, en condrocitos recién aislados (Cond. Aisl.) y en condrocitos cultivados durante 48h, 7 días y 15 días. (B) Expresión génica del colágeno de tipo 2 (COL2) en el cartílago total, en condrocitos recién aislados (Cond. Aisl.) y en condrocitos cultivados durante 48h, 7 días y 15 días. Datos expresados como media±error estándar de la media de al menos 4 experimentos independientes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

## **2. Estudio del papel de la LCN2 en el metabolismo de osteoblastos**

Dentro del factor metabólico de la OA, la obesidad y el tejido adiposo han sido descritos como importantes contribuyentes al inicio y progresión de esta enfermedad. En este sentido, la adipoquinas juegan un papel fundamental como mediadores de respuestas inflamatorias y catabólicas. De esta forma, se ha descrito que estas moléculas tienen una gran importancia en el daño de los diferentes tejidos articulares. Además, puesto que existe una relación entre estas estructuras de la articulación, podrían también participar en la comunicación entre ellas, especialmente en la unión osteocondral.

Entre estas adipoquinas, la LCN2 ha sido estudiada en el cartílago y en los condrocitos. Sin embargo, aunque se conoce que es altamente inducida en ausencia de carga mecánica en los OB [31], la regulación de su expresión en el hueso y los OB y su significado biológico en este contexto es menos conocido. Por ello, nuestro siguiente objetivo fue estudiar la regulación de esta adipoquina en los OB y en su relación con los condrocitos articulares.

### **2.1. Regulación de la expresión de la LCN2 durante la diferenciación osteoblástica**

Durante la diferenciación de las células mesenquimales a las estirpes condrogénica y adipogénica [51, 222, 225], ha sido descrito que la expresión de la LCN2 se ve incrementada en los estadios más diferenciados. Sin embargo, en el caso de los osteoblastos, con un origen igualmente mesenquimal, no se conoce qué ocurre con la expresión de esta adipoquina. Por ello, en primer lugar estudiamos la expresión de la LCN2 durante la diferenciación de las células pre-osteoblásticas de ratón MC3T3.

A lo largo de la diferenciación de las células hasta 29 días, observamos un aumento de marcadores de diferenciación como la FA y el Runx2 (Figura 14A-B), así como un aumento de la mineralización de la matriz mediante tinción con rojo alizarina (Figura 14D).

Acompañando el aumento de marcadores de diferenciación, encontramos una reducción muy significativa de la expresión de la LCN2. Esta disminución en la expresión fue mucho más marcada durante los dos primeros días del proceso de diferenciación (Figura 14C). Sin embargo, la adición de LCN2 exógena (datos no mostrados) y o su

sobreexpresión (Figura 15) no afectaron a la expresión de los marcadores de diferenciación.

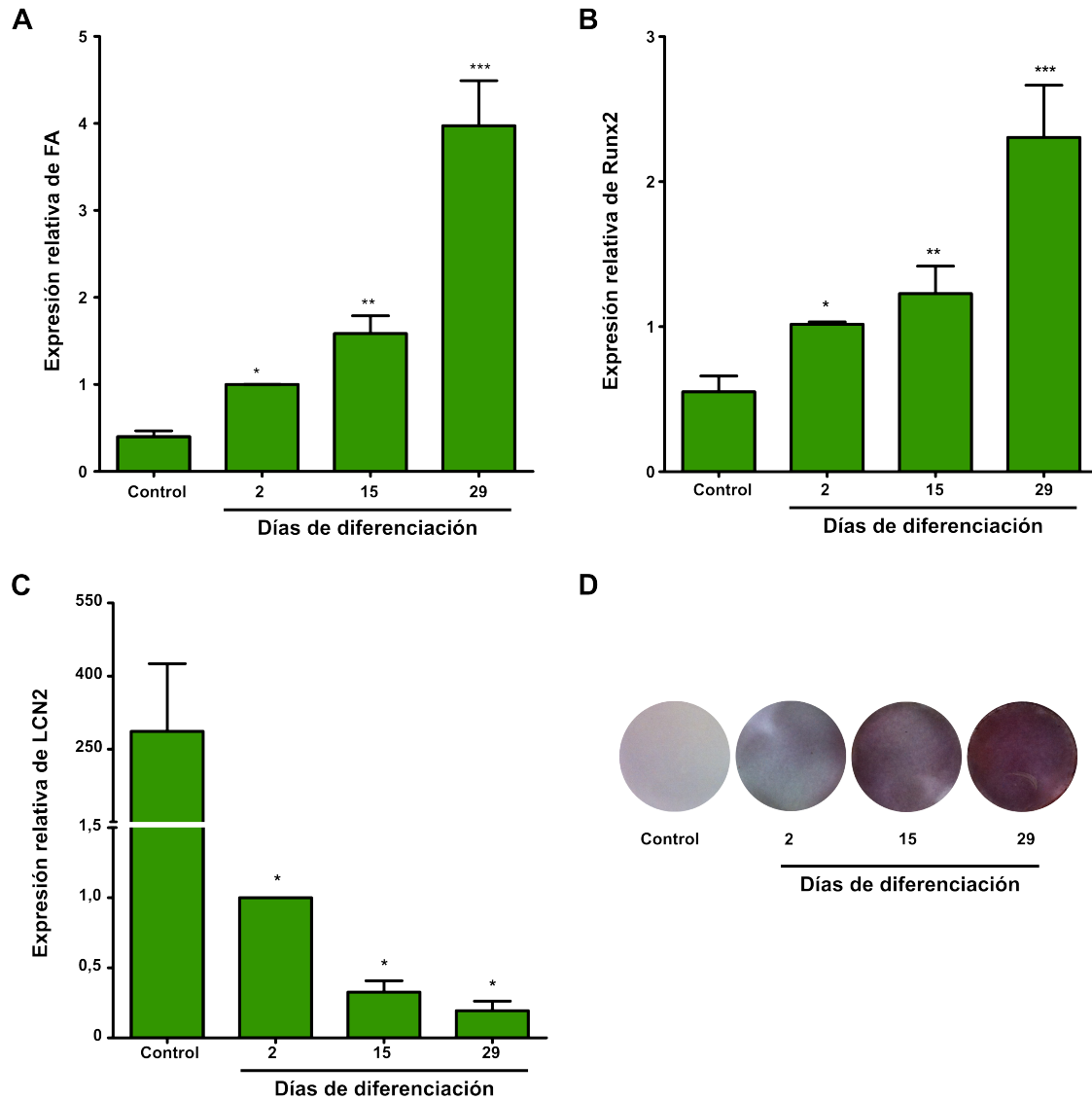


Figura 14. Estudio de la diferenciación osteoblástica de las células MC3T3-E1. Las células MC3T3-E1 fueron diferenciadas durante 2, 15 y 29 días en presencia de 50µg/ml de ácido L-ascórbico y 10mM de β-glicerol fosfato. (A) Expresión génica de la fosfatasa alcalina (FA) durante la diferenciación osteoblástica. (B) Expresión génica del Runx2 durante la diferenciación osteoblástica. (C) Expresión génica de la lipocalina 2 (LCN2) durante la diferenciación osteoblástica. (D) Estudio de la mineralización de las células MC3T3-E1 por tinción con rojo de alizarina. Datos expresados como media±error estándar de la media de al menos 3 experimentos independientes. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

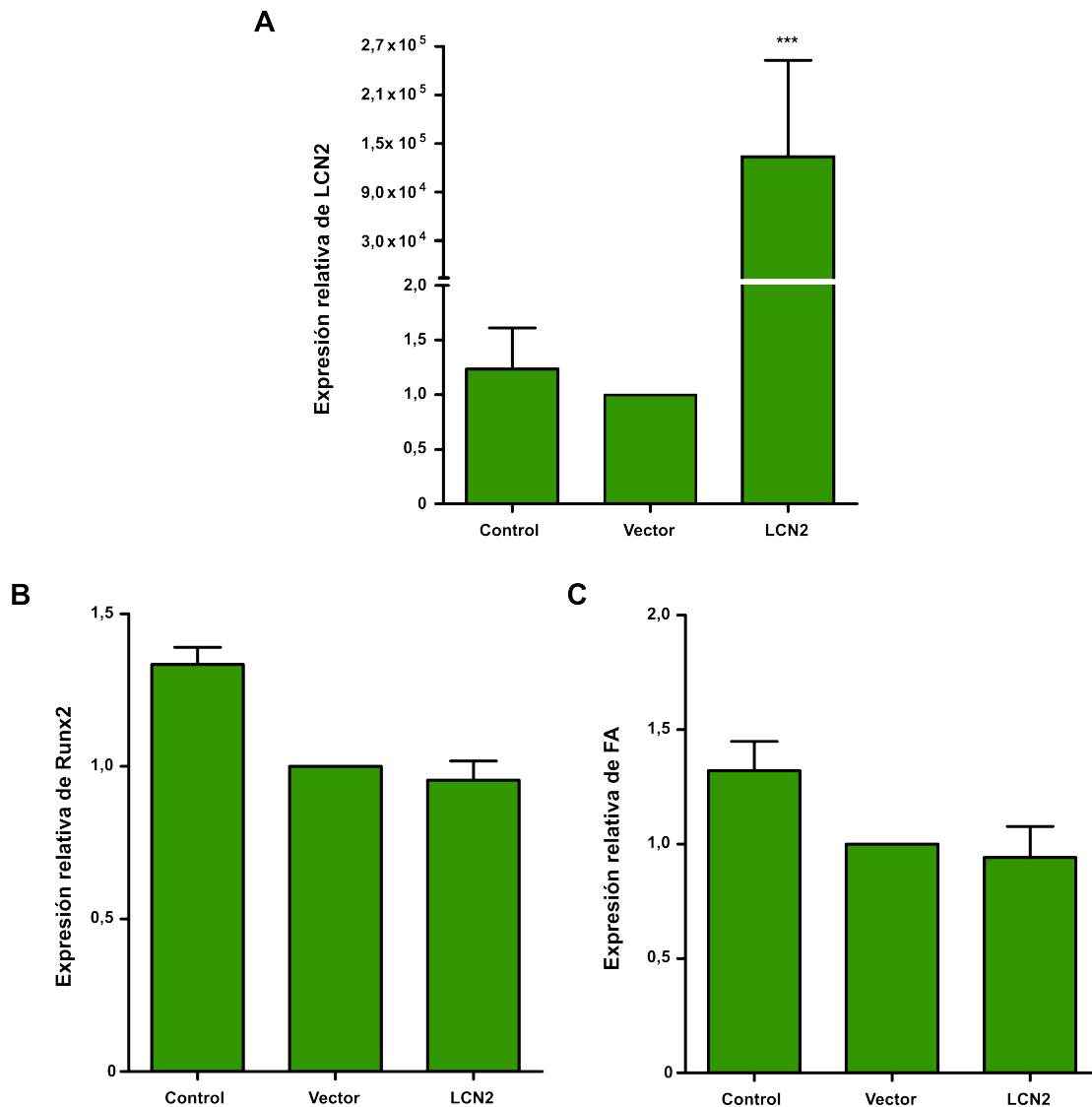


Figura 15. Estudio de la expresión génica en las células MC3T3-E1 con sobreexpresión de la lipocalina 2 (LCN2). Las células fueron transfectadas con el plásmido pCMV6-LCN2-GFP o con el plásmido vector. Tras 24h de transfección, se permitió a las células una recuperación en medio completo durante 24h y a continuación se realizaron estudios de expresión génica. (A) Expresión génica de la LCN2 tras la transfección. (B) Expresión génica del Runx2 tras la sobreexpresión de la LCN2. (C) Expresión génica de la fosfatasa alcalina (FA) tras la sobreexpresión de LCN2. Datos expresados como media±error estándar de la media de al menos 3 experimentos independientes. \*\*\*p<0,001.

No obstante, el tratamiento de las células ya diferenciadas con 10μM de Dx, concentración a la cuál este glucocorticoide ha sido previamente descrito como un factor desdiferenciador [111, 127, 185], indujo una disminución de la expresión de la FA acompañada de un significativo aumento de la LCN2 (Figura 16).

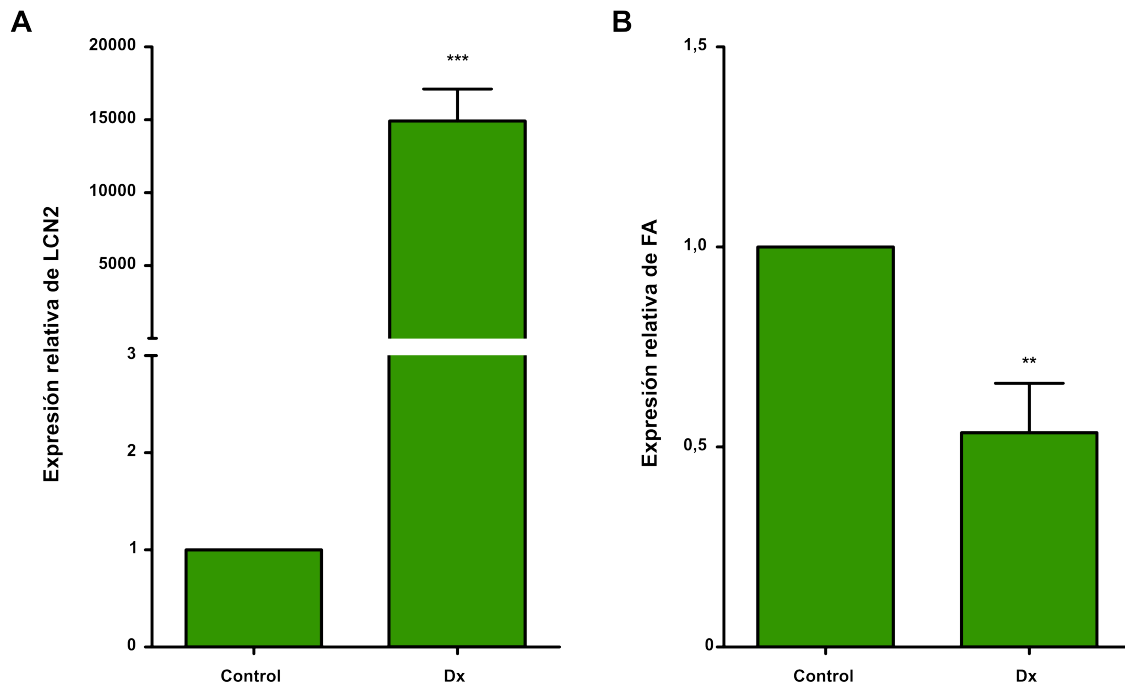


Figura 16. Estudio del efecto de la dexametasona (Dx) sobre la expresión génica en las células MC3T3-E1. Las células fueron diferenciadas durante 15 días y, a continuación, fueron tratadas durante 48h con 10 $\mu$ M de Dx en medio de diferenciación. (A) Expresión génica de la lipocalina 2 (LCN2). (B) Expresión génica de la fosfatasa alcalina (FA). Datos expresados como media $\pm$ error estándar de la media de al menos 3 experimentos independientes. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

## 2.2. La LCN2 es regulada por factores inflamatorios en los osteoblastos de ratón

Puesto que la LCN2 presenta un papel relevante en la regulación de la respuesta inflamatoria y catabólica de diversos tipos celulares, es importante conocer su modulación por factores pro-inflamatorios también en los OB. Para ello, estudiamos su expresión tras la estimulación con 1 $\mu$ g/ml de LPS y 1ng/ml de IL-1 $\beta$ , ya que tanto IL-1 $\beta$  como distintos agonistas del TLR4 pueden estar presentes y afectar al hueso subcondral en un entorno de inflamación y catabolismo articular o de inflamación sistémica mantenida en el caso de la obesidad u otros factores. Como se puede apreciar en la figura 17A, ambos factores indujeron un aumento significativo de la expresión de la LCN2 en las células MC3T3.

Además, quisimos determinar como afectaba la presencia de la Dx a la inducción de la LCN2 por estos factores pro-inflamatorios, puesto que además de tener un efecto catabólico sobre el hueso los glucocorticoides son también utilizados como tratamiento

anti-inflamatorio en las patologías articulares. De esta forma, como ha sido descrito en condrocitos [51], observamos que la combinación de estos factores produjo un efecto sinérgico en la inducción de la LCN2 en los OB (Figura 17B-C).

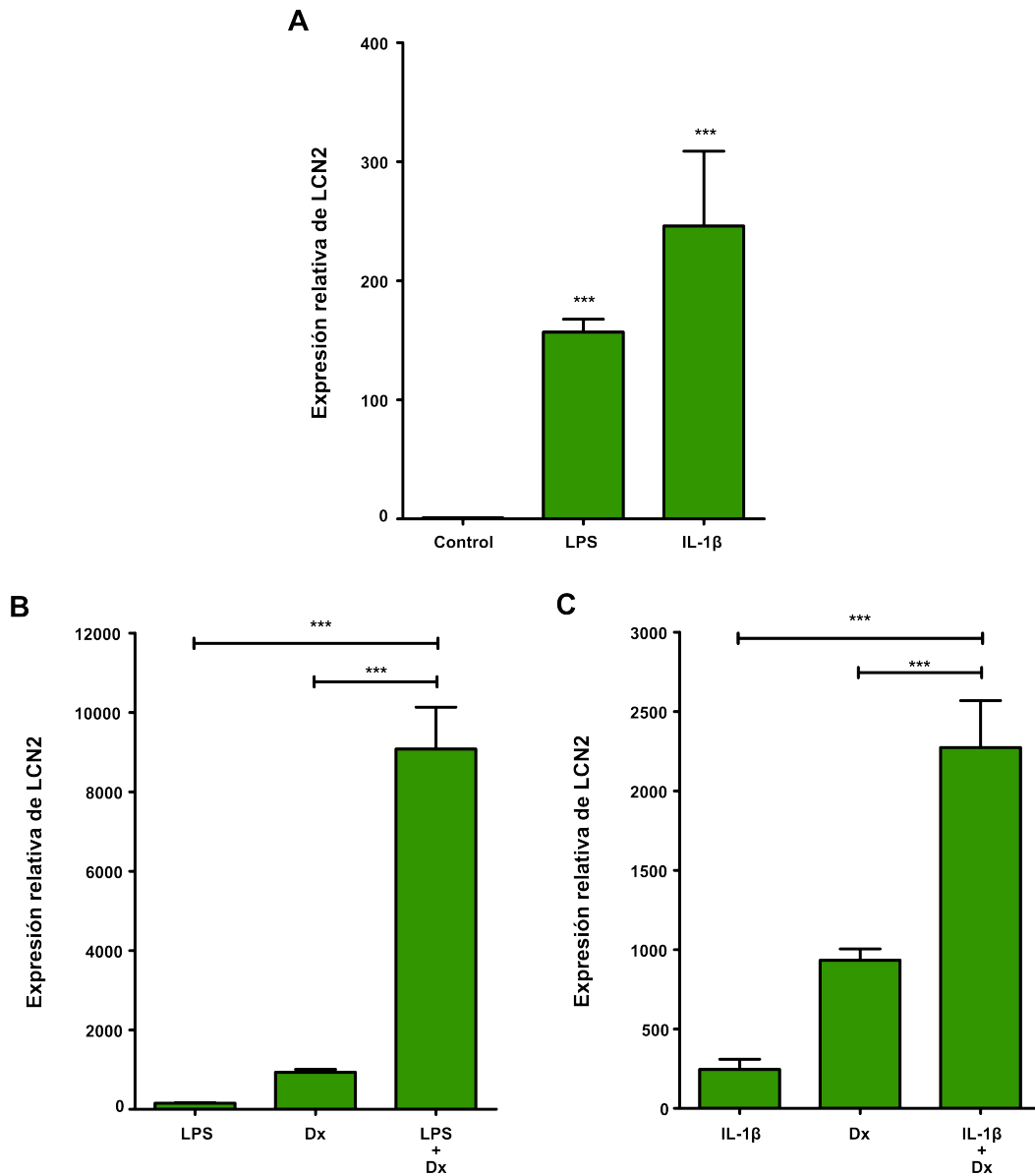


Figura 17. Estudio de la modulación de la expresión génica de la lipocalina 2 (LCN2) por factores inflamatorios en las células MC3T3-E1. Las células fueron cultivadas y, tras 18h de privación de FBS, fueron tratadas con 1ng/ml de IL-1 $\beta$  o 1 $\mu$ g/ml de LPS en presencia o ausencia de 10 $\mu$ M de dexametasona (Dx). (A) Expresión génica de la LCN2 en presencia de los factores pro-inflamatorios LPS e IL-1 $\beta$ . (B) Efecto de la adición de la Dx a la expresión de la LCN2 inducida por el LPS. (C) Efecto de la adición de la Dx a la expresión de la LCN2 inducida por la IL-1 $\beta$ . Datos expresados como media $\pm$ error estándar de la media de al menos 3 experimentos independientes. \*\*\*p<0,001.

### **2.3. El aumento de la LCN2 incrementa la citotoxicidad del hierro y la actividad MMP-9 en los osteoblastos**

Con el objetivo de investigar la función de esta adipocina en el metabolismo osteoblástico, decidimos estudiar su efecto sobre diferentes factores.

Por un lado, puesto que se conoce que en distintos tipos celulares la LCN2 puede promover la supervivencia o la muerte celular [100], nos propusimos estudiar su efecto sobre la vitalidad de los OB. El medio de cultivo enriquecido en LCN2 proveniente de células que sobreexpresan esta adipocina no tuvo efecto sobre la viabilidad de las MC3T3 (Figura 18A).

Sin embargo, dado que la LCN2 es una molécula caracterizada por su capacidad para transportar hierro a través de la membrana celular, y que el hierro es inhibidor de la vitalidad osteoblástica [60, 90, 220], decidimos determinar si estas dos características en conjunción alterarían la vitalidad de las MC3T3. Para ello, incubamos las células MC3T3 con medio condicionado enriquecido en LCN2 en presencia de diferentes dosis de un donador de iones de hierro como es el citrato férrico de amonio (CFA). De esta forma, observamos que la presencia de la LCN2 en el medio de cultivo incrementó la toxicidad del hierro en estas células (Figura 18B).

Además del efecto sobre la vitalidad, la LCN2 presenta un papel catabólico mediante la estabilización de la MMP-9 en el líquido sinovial y en la orina [79, 221]. Por ello, estudiamos la capacidad de la LCN2 de estabilizar y aumentar la actividad de la MMP-9 producida por las células MC3T3. Con esta finalidad, recogimos el sobrenadante de las células MC3T3 cultivadas y lo incubamos con 36ng/ml de LCN2 recombinante para permitir la formación de los complejos LCN2/MMP-9. Después se estudió la actividad de la MMP-9 mediante zimografía, y observamos un aumento de la actividad en las bandas de aproximadamente 110 y 200KDa, correspondientes al monómero y al dímero de LCN2/MMP-9 respectivamente (Figura 18C-D).

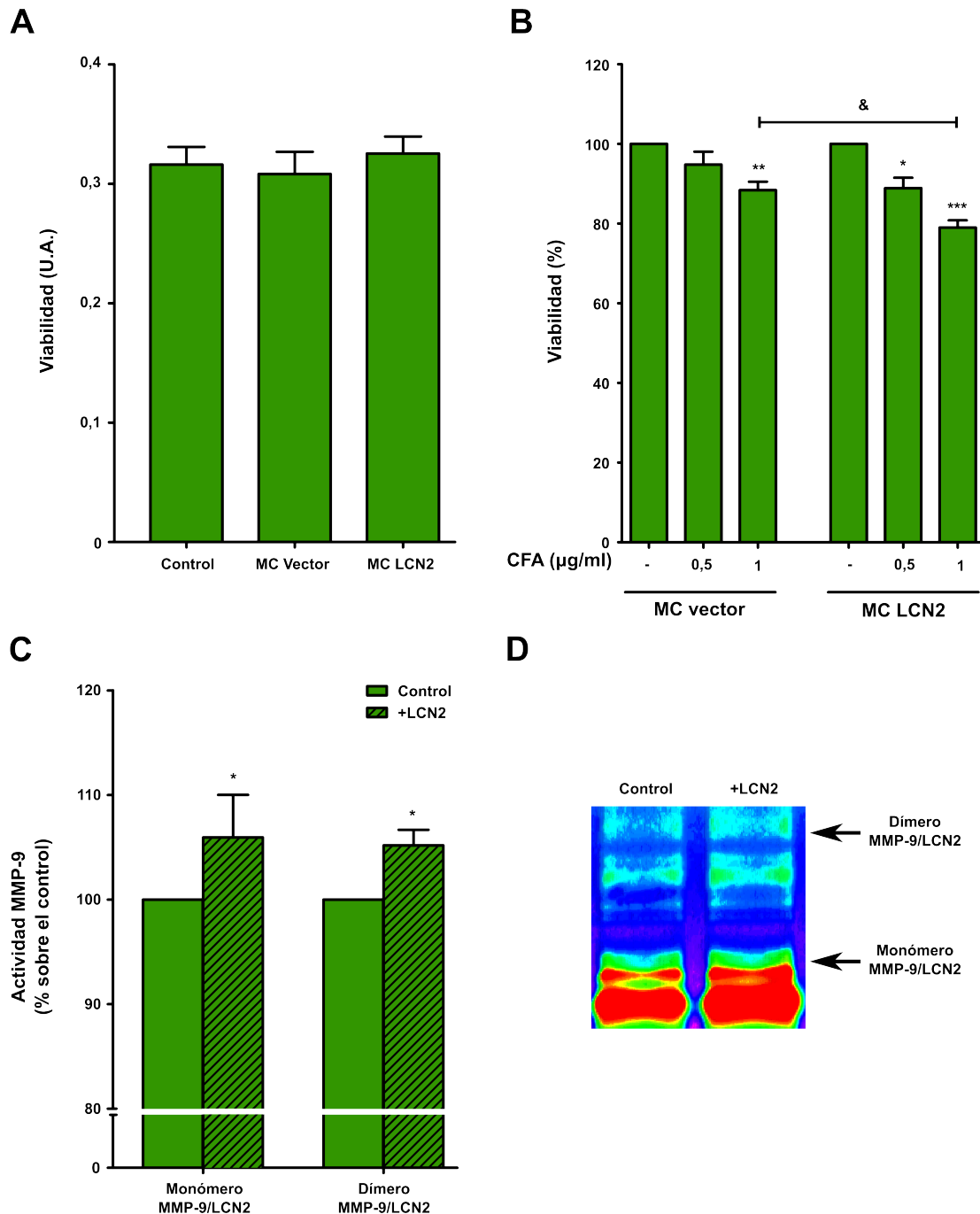


Figura 18. Estudio del efecto de la lipocalina 2 (LCN2) sobre las células MC3T3-E1. (A) Tras 18h de privación de FBS, las células fueron incubadas durante 72h con medio condicionado (MC) proveniente de las células MC3T3-E1 transfectadas con LCN2 o con plásmido vector y la viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo de MTT. (B) La toxicidad del hierro fue estudiada en experimentos similares mediante la incubación de las células con los MC en presencia o ausencia de 0,5 o 1μg/ml de citrato férrico de amonio (CFA). (C) El MC de las células MC3T3 fue incubado con 36ng/ml de LCN2 recombinante de ratón durante 1h a 37°C. A continuación fue sometido a una zimografía para estudiar la actividad de la enzima MMP-9. Datos expresados como media±error estándar de la media de al menos 3 experimentos independientes. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs no estimulado; &p<0,05 vs MC vector.



#### **2.4. La expresión de la LCN2 es regulada en los osteoblastos humanos por factores inflamatorios, catabólicos y anabólicos**

Una vez estudiada la regulación de la LCN2 en la línea celular MC3T3, procedimos a confirmar si en los OB primarios humanos su modulación era similar.

Los factores inflamatorios IL-1 $\beta$  y LPS, así como la Dx, fueron capaces de inducir la expresión de la LCN2 en los OB humanos, lo cual fue confirmado también a nivel de proteína mediante *western blot* (Figura 19A-B). Además, del mismo modo que ocurría en las células MC3T3, la Dx presentó un efecto sinérgico con los factores pro-inflamatorios en la inducción de la expresión de la LCN2 (Figura 19C-D).

Por otro lado, está descrito que la carga mecánica tiene efecto anabólico sobre el hueso, promoviendo la supervivencia y la función osteoblástica [172]. En cambio, la ausencia de estímulos mecánicos es capaz de inducir la expresión de la LCN2 [31]. Por tanto, decidimos estudiar el efecto sobre la inducción de la LCN2 en los OB primarios humanos de otros factores anabólicos para el hueso como son el IGF-1 y el TGF $\beta$ , que además de ser inducidos por la carga mecánica en el hueso también están relacionados con fisiopatología de la OA [19, 110, 153, 162, 228].

De acuerdo con el potencial efecto catabólico de la LCN2, tanto el IGF-1 como el TGF $\beta$  fueron capaces de revertir la inducción de su expresión por los factores inflamatorios. En el caso del TGF $\beta$ , incluso la expresión basal de la LCN2 fue disminuida por este factor. Sin embargo, ninguno de los dos afectó a la expresión inducida por la Dx (Figura 20).

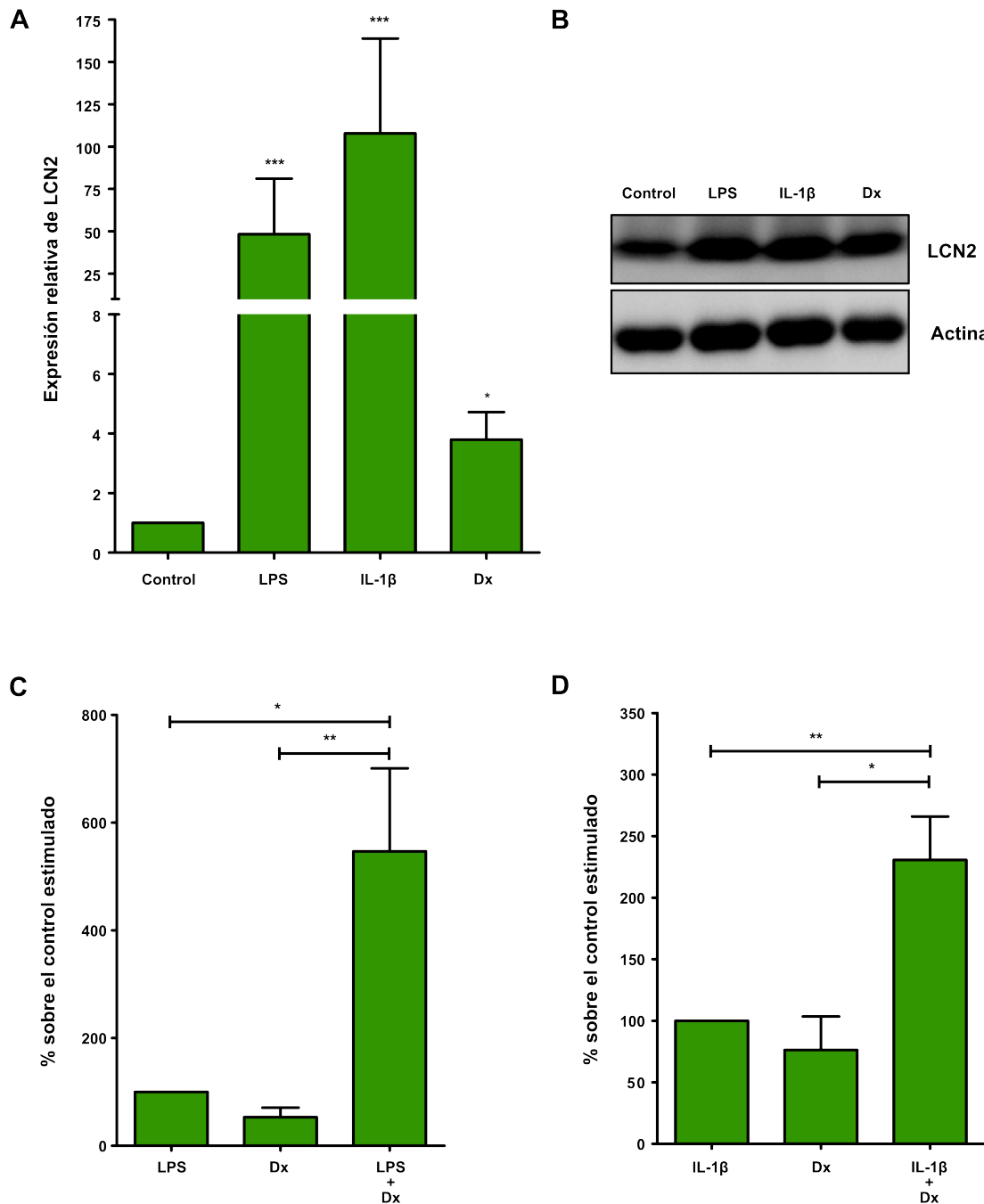


Figura 19. Estudio de la modulación de la expresión de la lipocalina 2 (LCN2) por factores inflamatorios en los osteoblastos primarios humanos. Las células fueron cultivadas y, tras 18h con 1% FBS, fueron tratadas con 1ng/ml de IL-1 $\beta$  o 1 $\mu$ g/ml de LPS en presencia o ausencia de 10 $\mu$ M de dexametasona (Dx). (A) Expresión génica de la LCN2 en presencia de los estímulos LPS, IL-1 $\beta$  y Dx. (B) Confirmación de la inducción de la LCN2 a nivel de expresión proteica mediante *western blot*. (C) Efecto de la adición de la Dx a la expresión de la LCN2 inducida por el LPS. (D) Efecto de la adición de la Dx a la expresión de la LCN2 inducida por la IL-1 $\beta$ . Datos expresados como media $\pm$ error estándar de la media de al menos 4 experimentos independientes. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

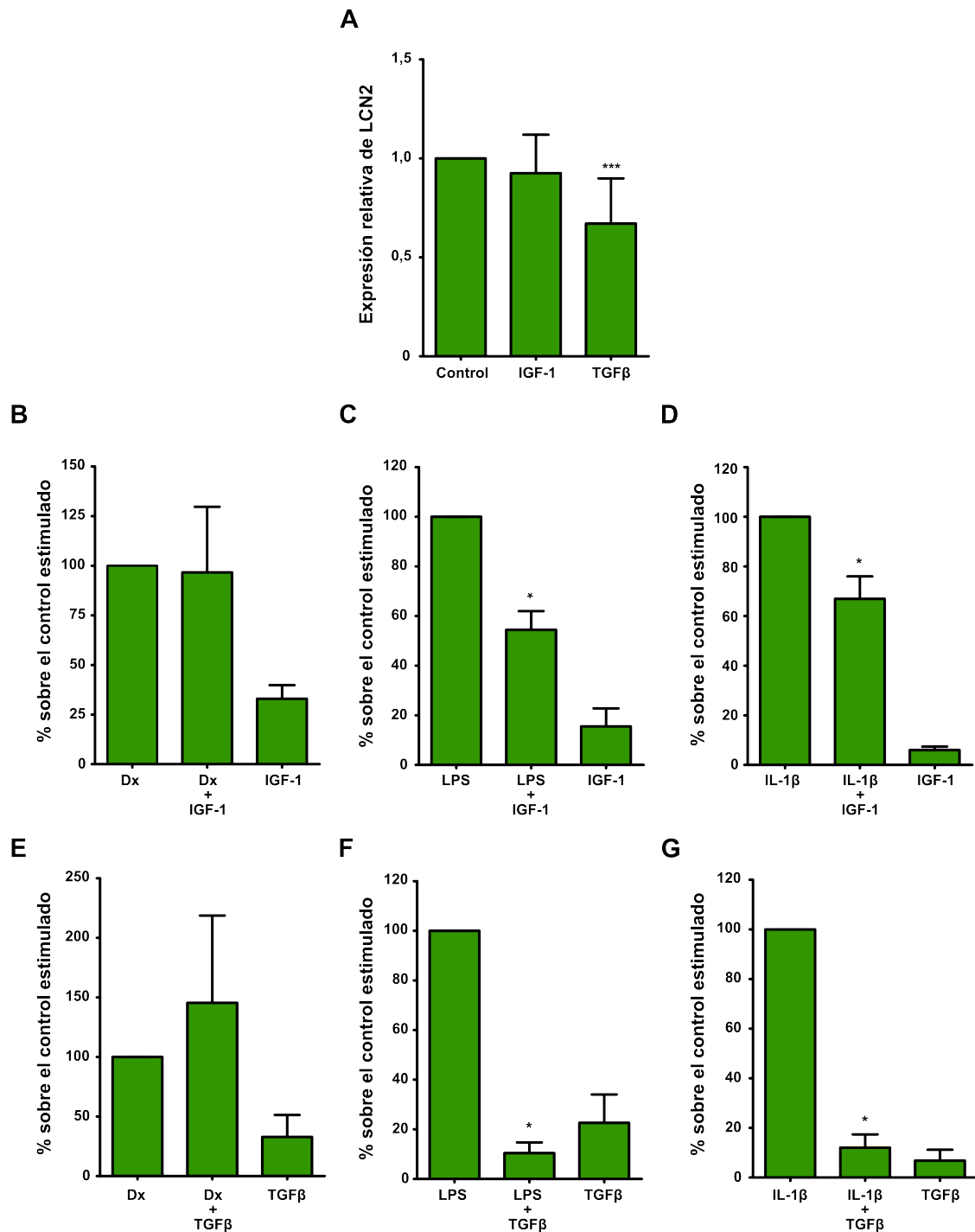


Figura 20. Estudio de la modulación de la expresión génica de la lipocalina 2 (LCN2) por factores anabólicos en los osteoblastos primarios humanos. Las células fueron cultivadas y, tras 18h con 1% FBS, fueron tratadas con 1ng/ml de IL-1β, 1μg/ml de LPS o 10μM de dexametasona (Dx), en presencia o ausencia 100ng/ml de IGF-1 o 10ng/ml de TGFβ. (A) Expresión génica de la LCN2 en presencia de los factores anabólicos IGF-1 y TGFβ. (B-D) Efecto del IGF-1 sobre la inducción de la expresión de la LCN2 por la Dx (B), el LPS (C) y la IL-1β (D). (E-G) Efecto del TGFβ sobre la inducción de la expresión de la LCN2 por la Dx (E), el LPS (F) y la IL-1β (G). Datos expresados como media±error estándar de la media de al menos 4 experimentos independientes. \*p<0,05; \*\*\*p<0,001.

## 2.5. Regulación de la expresión de la LCN2 en la relación entre los osteoblastos y los condrocitos

Para analizar la modulación de la LCN2 en la unión osteocondral durante un ambiente patológico, realizamos una aproximación *in vitro* utilizando medios condicionados de células previamente estimuladas con la IL-1 $\beta$  o la Dx, ya que la primera está relacionada con la patogenia de la OA y la segunda con su tratamiento [81, 216].

Estos experimentos mostraron que la estimulación de los OB humanos tanto con la IL-1 $\beta$  como con la Dx induce la producción de mediadores que promueven un aumento de la expresión de la LCN2 en los condrocitos humanos (Figura 21A). Sin embargo, los condrocitos humanos estimulados no tuvieron efecto sobre la producción de la LCN2 en los OB (Figura 21B).

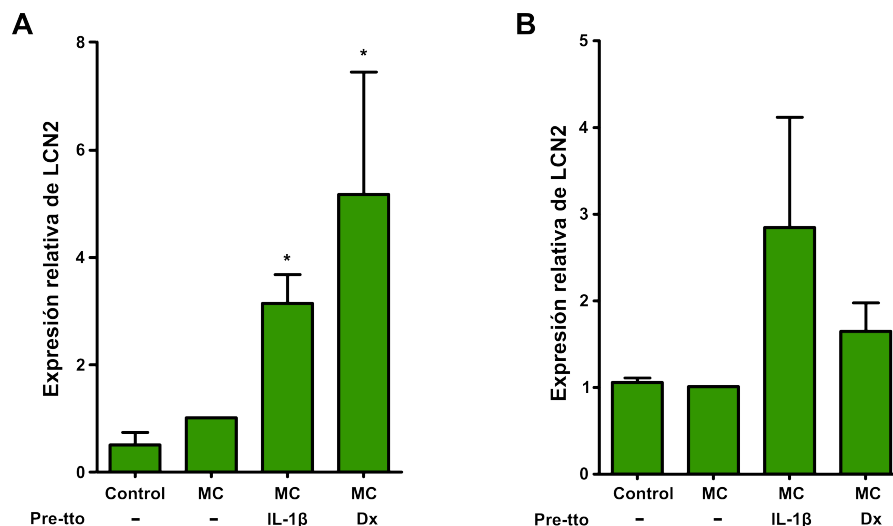


Figura 21. Estudio de la modulación de la lipocalina 2 (LCN2) en los condrocitos y los osteoblastos primarios humanos mediante medios condicionados (MC). Las células fueron cultivadas hasta confluencia y, tras 18h de privación de suero para los condrocitos y con 1% FBS para los osteoblastos, las células fueron estimuladas durante 24h con 1ng/ml de IL-1 $\beta$  o 10 $\mu$ M de dexametasona (Dx). A continuación se cambió el sobrenadante por medio de cultivo fresco y se dejó condicionar por las células durante 24h. El MC fue recogido y utilizado para estimular células durante 48h. (A) Expresión de la LCN2 en los condrocitos estimulados con MC de los osteoblastos primarios humanos. (B) Expresión de la LCN2 en los osteoblastos estimulados con MC de los condrocitos primarios humanos. Datos expresados como media $\pm$ error estándar de la media de al menos 4 experimentos independientes. \*p<0,05.

## 2.6. Regulación por factores anabólicos de la expresión de la LCN2 en los condrocitos

Puesto que los OB estimulados son capaces de inducir la expresión de la LCN2 en los condrocitos, procedimos a estudiar la regulación de la LCN2 en los condrocitos primarios humanos. Durante la comunicación entre el hueso y el cartílago en la unión osteocondral, es importante tener en cuenta el factor mecánico que participa en la regulación de la expresión de diferentes moléculas, pero también las moléculas que actúan de forma paracrina entre estos dos tejidos. Así, decidimos estudiar el efecto de factores pro-inflamatorios, catabólicos y anabólicos que podrían proceder de un entorno articular inflamado, de alteraciones de la carga mecánica e incluso del propio hueso subcondral *in vivo* durante la OA.

Como ya ha sido descrito por otros autores [51, 74, 143], los factores inflamatorios como la IL-1 $\beta$  y el LPS y los catabólicos como la Dx son capaces de inducir la expresión de la LCN2 (Figura 22A). En cuanto a los factores anabólicos relacionados con el metabolismo óseo, el TGF $\beta$  revirtió la inducción de la LCN2 por los factores pro-inflamatorios, pero no tuvo efecto sobre la inducción por la Dx, como ocurría en el caso de los OB (Figura 22D-F). Sin embargo, el IGF-1 sí revirtió en los condrocitos la expresión de la LCN2 inducida por la Dx al igual que la estimulada por la IL-1 $\beta$ , pero en este caso no fue capaz de contrarrestar la inducción por la activación del TLR4 (Figura 22B-D).

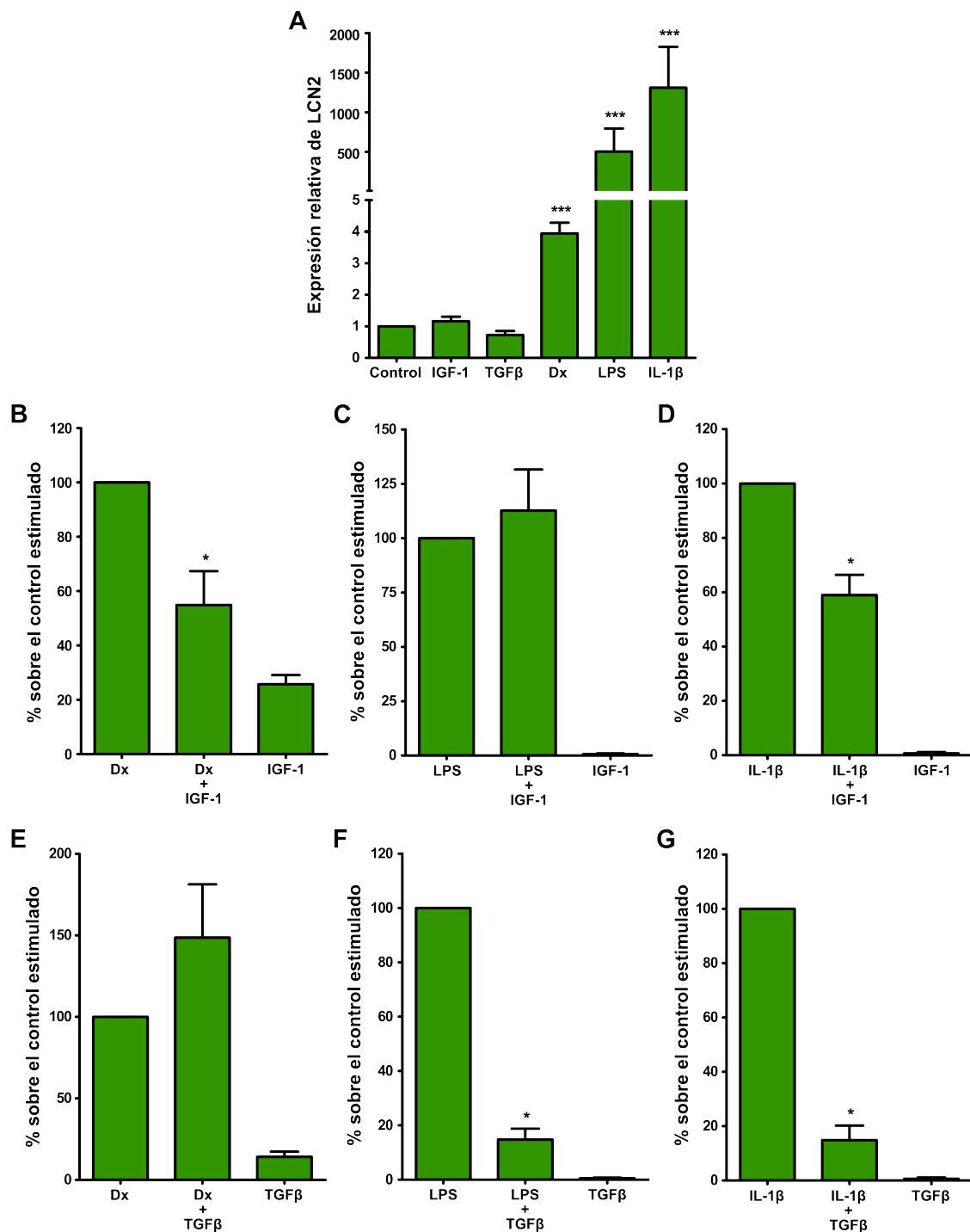


Figura 22. Estudio de la modulación de la expresión génica de la lipocalina 2 (LCN2) en los condrocitos primarios humanos. Las células fueron cultivadas y, tras 18h de privación de FBS, fueron tratadas con 1ng/ml de IL-1β, 1μg/ml de LPS o 10μM de dexametasona (Dx), en presencia o ausencia 100ng/ml de IGF-1 o 10ng/ml de TGFβ. (A) Expresión génica de la LCN2 en presencia de los factores IGF-1, TGFβ, Dx, LPS e IL-1β. (B-D) Efecto del IGF-1 sobre la inducción de la expresión de la LCN2 por la Dx (B), el LPS (C) y la IL-1β (D). (E-G) Efecto del TGFβ sobre la inducción de la expresión de la LCN2 por la Dx (E), el LPS (F) y la IL-1β (G). Datos expresados como media±error estándar de la media de al menos 4 experimentos independientes. \*p<0,05; \*\*\*p<0,001.

### **3. Estudio del efecto del tratamiento con la PTH[1-34] sobre la inflamación sinovial asociada a la OA**

El tratamiento con la PTH[1-34] ha sido demostrado en nuestro grupo como una estrategia eficaz no sólo para mejorar la calidad del hueso subcondral sino también para reducir el daño en el cartílago articular en un modelo de conejo de OA agravada por una OP previa [14]. Conocidos estos beneficios sobre dos tejidos tan importantes en el desarrollo de la OA, es interesante determinar si este tratamiento presentaría también propiedades beneficiosas sobre el desarrollo de la sinovitis que aparece en un importante porcentaje de pacientes con esta enfermedad. Por tanto, decidimos determinar el efecto del tratamiento con la PTH[1-34] sobre la sinoviopatía desarrollada en el modelo animal de OA agravada por OP.

#### **3.1. La PTH[1-34] reduce el grado de sinovitis en conejos con OA agravada por OP**

En primer lugar, tras el tratamiento intermitente con la PTH[1-34] para promover los efectos anabólicos descritos para esta molécula, se realizó una valoración del grado de sinoviopatía en estos animales mediante la escala de Krenn.

La cuantificación total de sinovitis apareció reducida tras el tratamiento con la PTH[1-34] con respecto a los animales OPOA tratados con el vehículo (Figura 23D). De los tres factores estudiados en esta valoración, el grosor de la capa íntima y la presencia de vasos y alteraciones de la matriz fueron los parámetros que contribuyeron a este efecto global, con una disminución en la graduación de ambos (Figura 23A-B). Sin embargo, el nivel de infiltrado celular no se vio modificado por el tratamiento (Figura 23C).

#### **3.2. El tratamiento con PTH[1-34] reduce la expresión de moléculas pro-inflamatorias y catabólicas**

Además de la valoración histológica, decidimos analizar la expresión de diferentes moléculas involucradas en el desarrollo de la patología. Entre ellas, observamos que la inducción de la MCP-1 en los animales con OPOA fue revertida por el tratamiento con PTH[1-34] (Figura 24C). Igualmente, la expresión de la MMP-13 se vio aumentada en los animales enfermos, mientras que la PTH[1-34] logró reducir sus niveles (Figura 24D). En cambio, la expresión de la MMP-9, la IL-1 $\beta$  y la COX-2 no se modificó con la generación de la OPOA (Figura 24A,B,E).

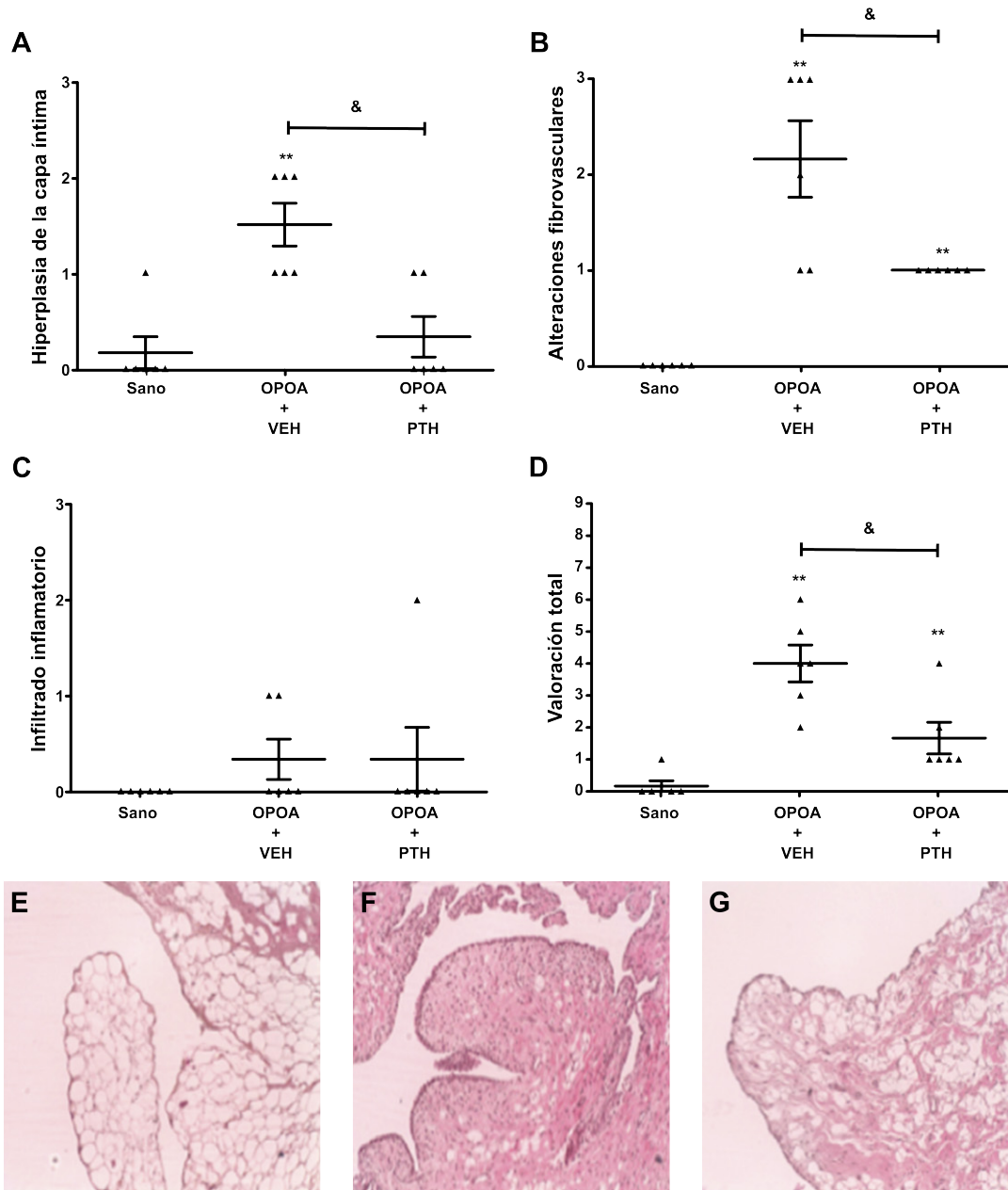


Figura 23. Estudio del grado de sinoviopatía en conejos sanos, en conejos con artrosis agravada por osteoporosis (OPOA) tratados con vehículo y conejos con OPOA tratados con dosis intermitentes de PTH[1-34] (10µg/kg/día 5 días a la semana, durante 10 semanas). La valoración se realizó en cortes de membranas sinoviales teñidos con hematoxilina y eosina mediante la escala de Krenn. (A) Valoración de la hiperplasia de la capa íntima. (B) Valoración de las alteraciones fibrovasculares. (C) Valoración del grado de infiltrado inflamatorio. (D) Valoración global del grado de sinoviopatía mediante la suma de los anteriores factores. Datos expresados como media±error estándar de la media de 6 animales diferentes por grupo experimental. \*\*p<0,01 vs sano; &p<0,05 vs OPOA+veh. (E) Imagen representativa de una membrana sinovial de un conejo sano. (F) Imagen representativa de una membrana sinovial de un conejo OPOA tratado con vehículo. (G) Imagen representativa de una membrana sinovial de un conejo OPOA tratado con PTH[1-34].



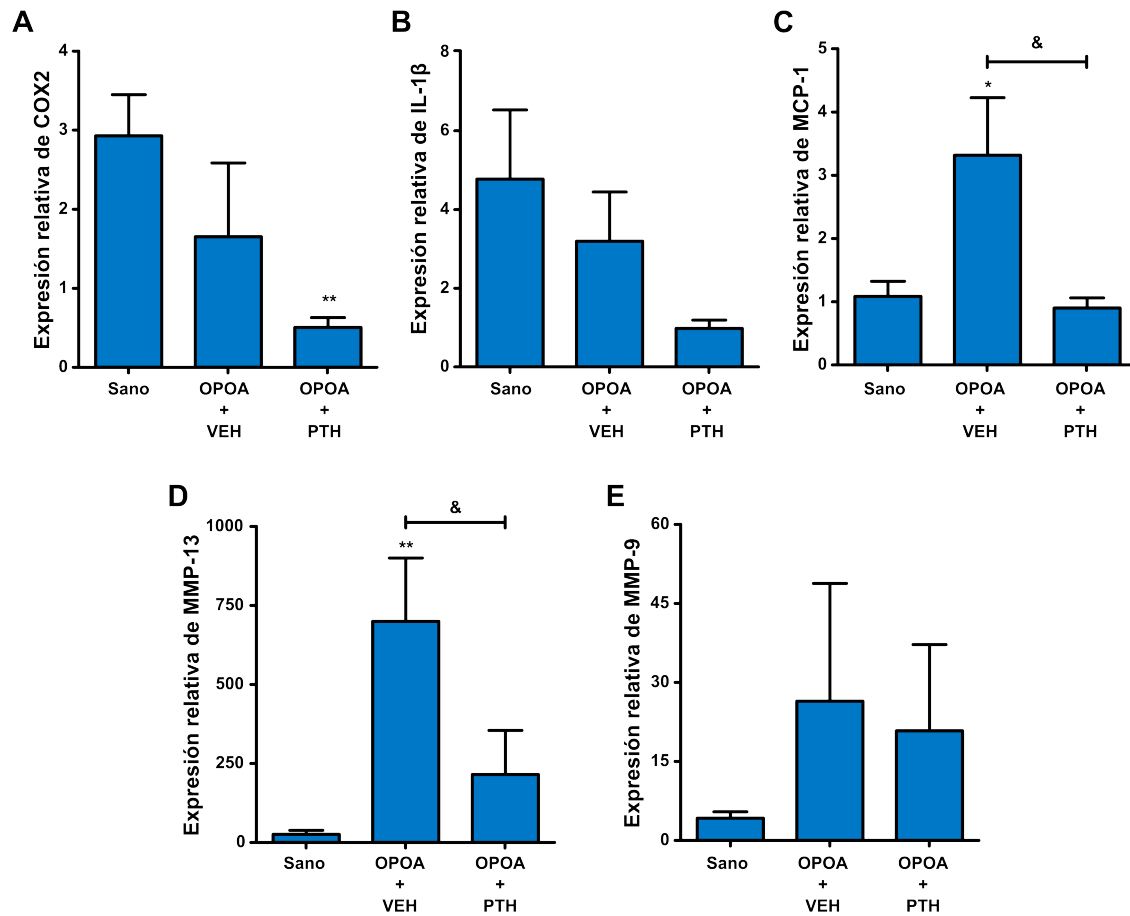


Figura 24. Estudio de la expresión génica de factores pro-inflamatorios y pro-catabólicos en las membranas sinoviales de conejos sanos, conejos con artrosis agravada por osteoporosis (OPOA) tratados con vehículo y conejos con OPOA tratados con dosis intermitentes de PTH[1-34] (10µg/kg/día 5 días a la semana, durante 10 semanas). (A) Expresión génica de la COX2. (B) Expresión génica de la IL-1β. (C) Expresión génica de la MCP-1. (D) Expresión génica de la MMP-13. (E) Expresión génica de la MMP-9. Datos expresados como media±error estándar de la media de 6 animales diferentes por grupo experimental. \*p<0,05 y \*\*p<0,01 vs sano; &p<0,05 vs OPOA+veh.

### 3.3. La PTH[1-34] reduce la fibrosis sinovial asociada a la OA

El COL1 es un marcador de fibrosis en la membrana sinovial, característica importante de la sinoviopatía OA ya que está asociada a la rigidez articular que se observa en esta enfermedad [141]. Por tanto, la expresión génica de esta molécula, así como su tinción inmunohistoquímica, fueron utilizadas para valorar el grado de fibrosis sinovial.

Ambas técnicas mostraron un aumento del componente fibrótico de las membranas sinoviales de los conejos OPOA, mientras que la presencia del COL1 fue reducida por el

tratamiento con la PTH[1-34] (Figura 25).

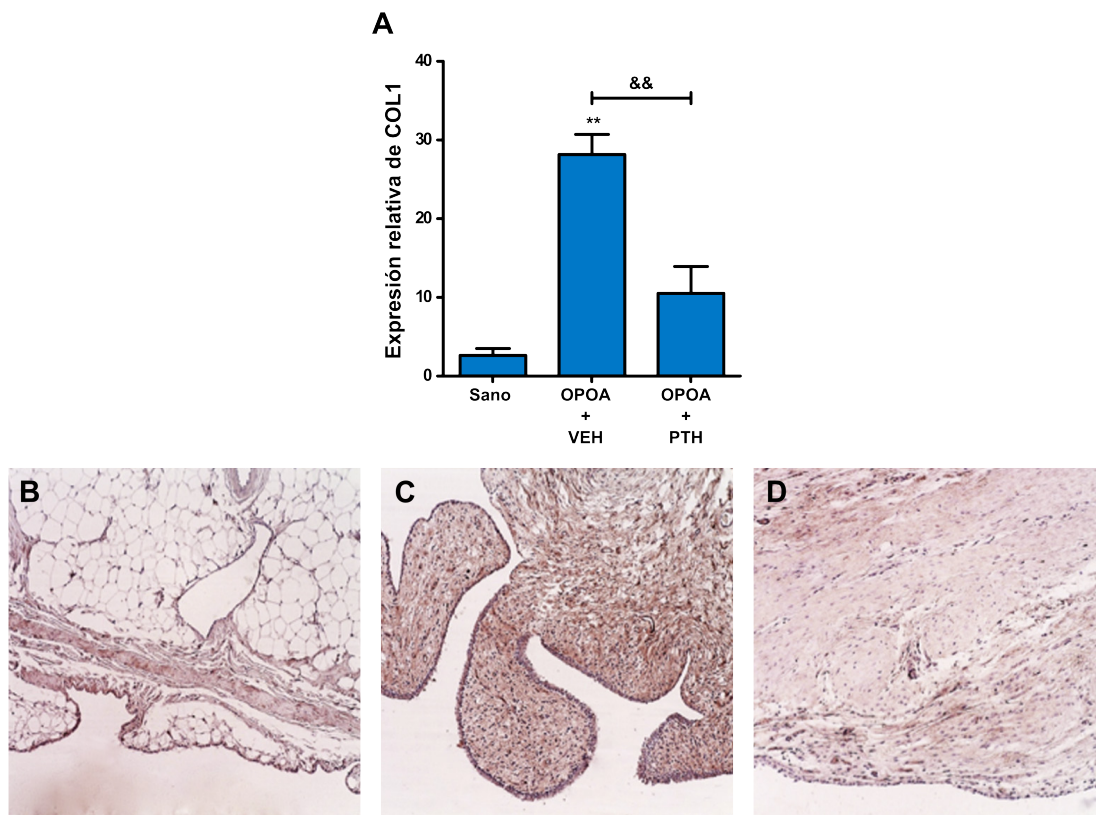


Figura 25. Estudio de la expresión del colágeno de tipo 1 (COL1) en las membranas sinoviales de conejos sanos, conejos con artrosis agravada por osteoporosis (OPOA) tratados con vehículo y conejos con OPOA tratados con dosis intermitentes de PTH[1-34] (10µg/kg/día 5 días a la semana, durante 10 semanas). (A) Expresión génica del COL1. Datos expresados como media±error estándar de la media de 6 animales diferentes por grupo experimental. \*\*p<0,01 vs sano; &&p<0,01 vs OPOA+veh. (B) Imagen representativa de la tinción inmunohistoquímica del COL1 en la membrana sinovial de un conejo sano. (C) Imagen representativa de la tinción inmunohistoquímica del COL1 en la membrana sinovial de un conejo OPOA tratado con vehículo. (D) Imagen representativa de la tinción inmunohistoquímica del COL1 en la membrana sinovial de un conejo OPOA tratado con la PTH[1-34].

#### **4. Estudio del efecto de derivados del jengibre sobre procesos tanto catabólicos como inflamatorios en los condrocitos**

Numerosos productos naturales son utilizados por la medicina tradicional china para tratar diversas dolencias. En el caso del jengibre (*Zingiber officinale*), su uso en diferentes afecciones, incluidas las enfermedades reumáticas, ha sido avalado por trabajos científicos que demuestran sus propiedades anti-inflamatorias [191, 200]. El 6-shogaol (6-S) es el componente principal del jengibre, con las mayores propiedades anti-inflamatorias [61]. Sin embargo, su efecto a nivel del cartílago articular no es bien conocido. Esta circunstancia nos llevó a estudiar el efecto de este compuesto sobre los condrocitos.

##### **4.1. El 6-S inhibe la respuesta inflamatoria mediada por la vía de señalización del TLR4 en las células ATDC5**

En primer lugar, se utilizó la línea celular pre-condrocítica ATDC5 para estudiar los efectos *in vitro* del 6-S (Figura 26A). Tras estudiar la toxicidad de diferentes dosis del 6-S mediante un estudio de la viabilidad celular con MTT, se seleccionó la dosis de 5µM al confirmar la ausencia de efectos nocivos sobre la viabilidad celular (Figura 26B).

A continuación, se trataron las células con el 6-S y después se estimularon con la IL-1β (1ng/ml) o el LPS (1µg/ml) durante 24h, los cuales son potentes agentes pro-inflamatorios involucrados en la patogenia de la OA [75, 216]. La producción de factores pro-inflamatorios se valoró mediante la cuantificación de la expresión génica de la IL-6 y la MCP-1, así como por la medida de la liberación del óxido nítrico a través del estudio de la concentración de nitritos en el medio de cultivo. El 6-S fue capaz de inhibir la inducción de la IL-6 y de la MCP-1, así como la producción del óxido nítrico, en las células estimuladas con el LPS. En cambio, no tuvo ningún efecto sobre la inducción de mediadores por la IL-1β (Figura 26C-E), sugiriendo una inhibición específica de la señalización del TLR4 y no del receptor de la IL-1β.

Para confirmar este efecto inhibitorio del 6-S sobre la señalización a través del TLR4, estudiamos la expresión de dos proteínas que son resultado de esta ruta: la enzima sintetasa de óxido nítrico 2 (*nitric oxide synthase 2*, NOS2) y la proteína adaptadora de la señalización del TLR4 y de la IL-1β, MyD88 (Figura 27A). El tratamiento con el 6-S inhibió la inducción de NOS2 y de MyD88 por la vía del TLR4, así como un evento

temprano de la señalización de este receptor como es la fosforilación de ERK1/2 (Figura 27B).

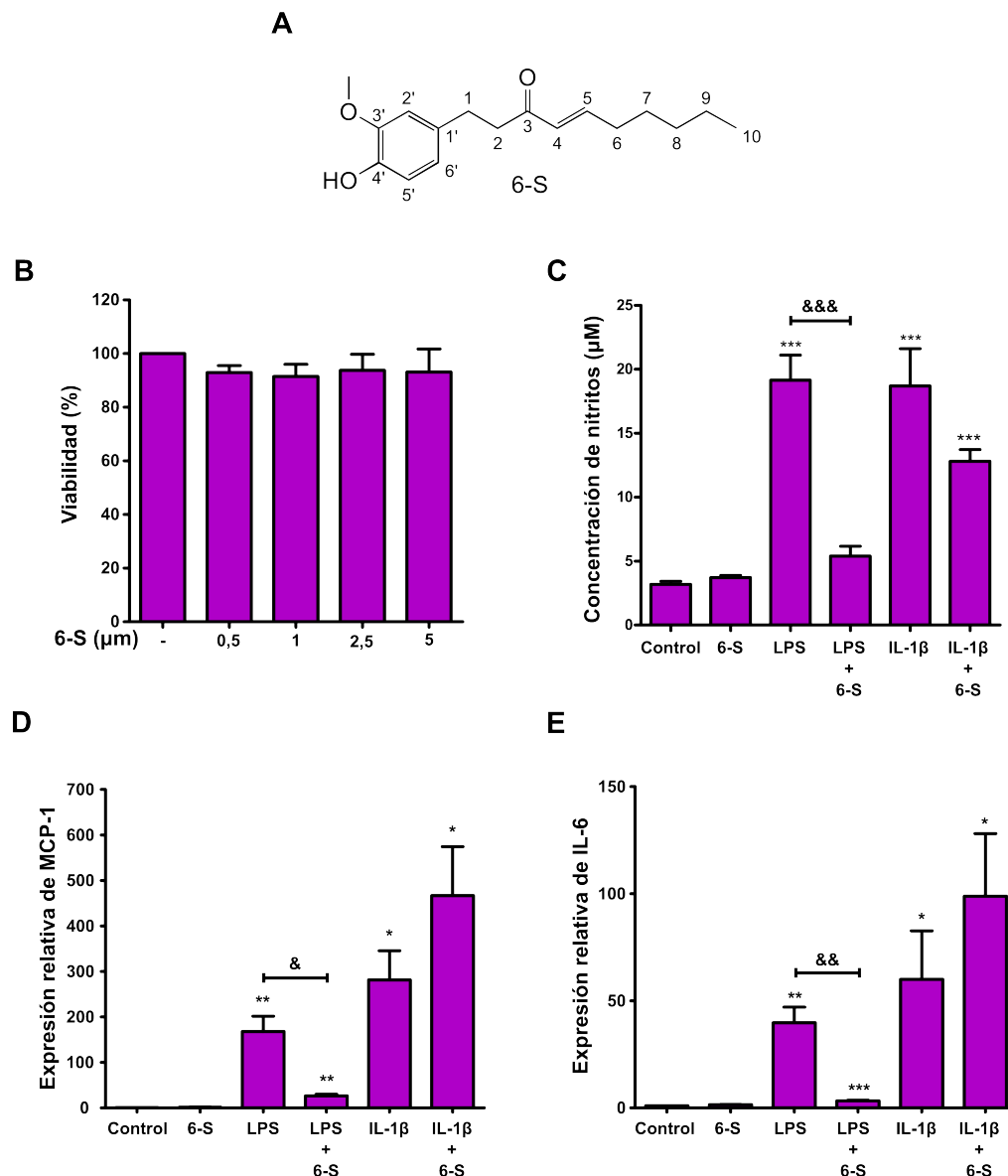


Figura 26. Estudio del efecto del 6-shogaol (6-S) en las células ATDC5. Las células fueron cultivadas y, tras 18h de privación de FBS, fueron tratadas con 1ng/ml de IL-1β o 1μg/ml de LPS durante 24h, con o sin pre-incubación con el 6-S durante 1h. (A) Estructura del compuesto 6-S. (B) Estudio del efecto de diferentes concentraciones del 6-S sobre la viabilidad celular. (C) Estudio del efecto de 5μM de 6-S sobre la producción de nitritos en el medio de cultivo de las células tratadas con la IL-1β o el LPS. (D) Estudio del efecto de 5μM de 6-S sobre la expresión génica de la MCP-1 en células tratadas con la IL-1β o el LPS. (E) Estudio del efecto de 5μM de 6-S sobre la expresión génica de la IL-6 en células tratadas con la IL-1β o el LPS. Datos expresados como media±error estándar de la media de al menos 3 experimentos independientes. \*p<0,05, \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001 vs control; &p<0,05, &&p<0,01 y &&&p<0,001 vs LPS.

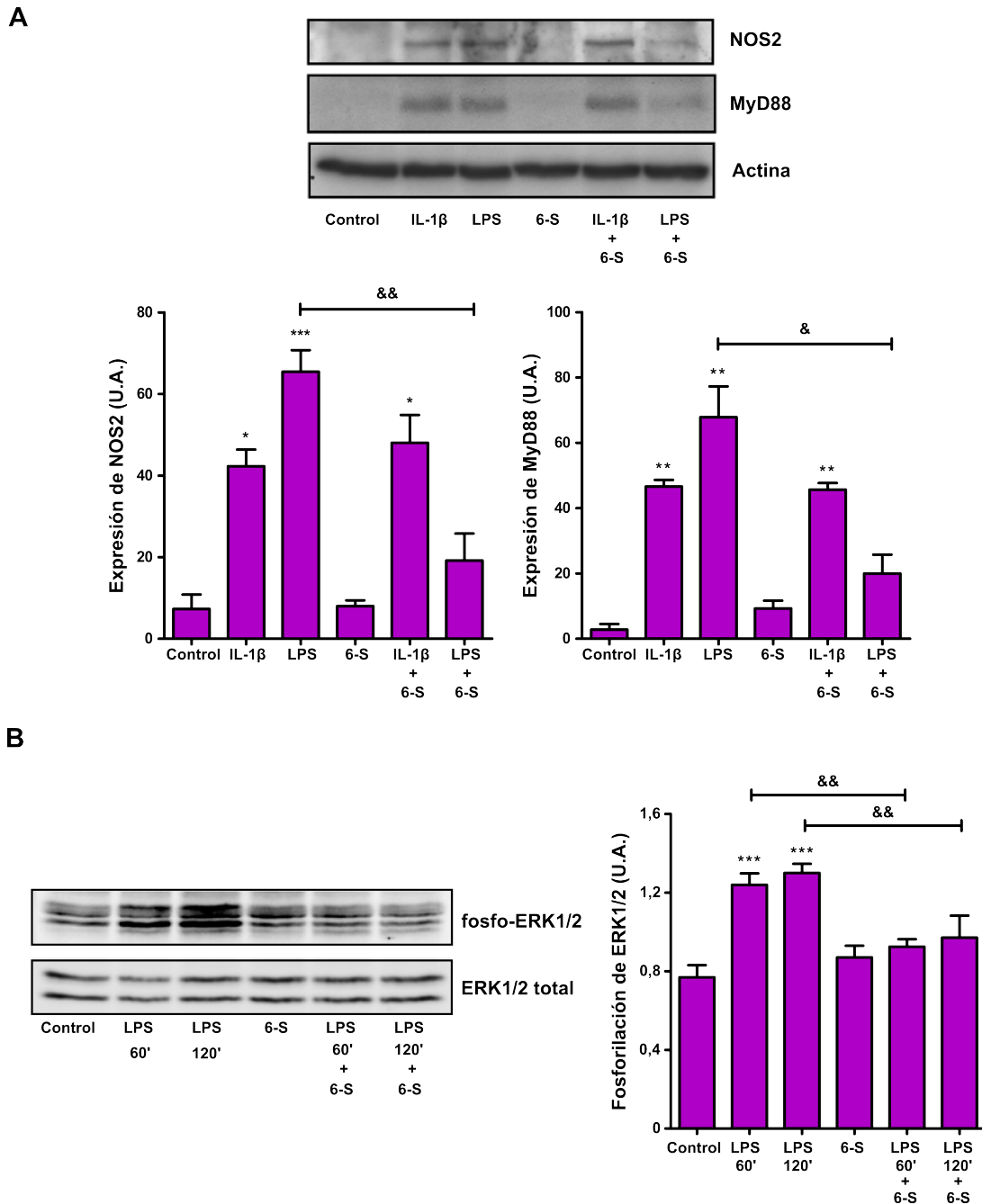


Figura 27. Estudio del efecto del 6-shogaol (6-S) sobre la expresión proteica de las células ATDC5. (A) Las células fueron cultivadas y, tras 18h de privación de FBS, fueron tratadas con 1ng/ml de IL-1 $\beta$  o 1 $\mu$ g/ml de LPS durante 24h, con o sin pre-incubación con 5 $\mu$ M de 6-S durante 1h. A continuación se evaluó la expresión proteica de la enzima óxido nítrico sintetasa 2 (NOS2) y de MyD88. Los datos fueron normalizados frente a la expresión de la actina. (B) Las células fueron cultivadas y, tras 18h de privación de FBS, fueron tratadas con 1 $\mu$ g/ml de LPS durante 1 ó 2h, con o sin pre-incubación con 5 $\mu$ M de 6-S durante 1h, para estudiar la fosforilación de ERK1/2. Los datos fueron expresados como la relación entre la cantidad de ERK1/2 fosforilado y la expresión total de ERK1/2. Datos expresados como media $\pm$ error estándar de la media de al menos 3 experimentos independientes. \* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01 y \*\*\* $p$ <0,001 vs control; & $p$ <0,05 y && $p$ <0,01 vs LPS.

#### 4.2. El 6-S es un inhibidor de la actividad MMP en las células ATDC5

Debido a la inducción de las MMPs que ocurre con los estímulos pro-inflamatorios, estudiamos el efecto del 6-S sobre la actividad de la MMP-2 y la MMP-9 en el medio de cultivo de las células ATDC5 estimuladas con el LPS.

Mediante ensayos de zimografía, observamos que el tratamiento con este compuesto derivado del jengibre disminuyó significativamente la actividad de ambas enzimas, mostrando un efecto no sólo anti-inflamatorio si no también anti-catabólico (Figura 28).

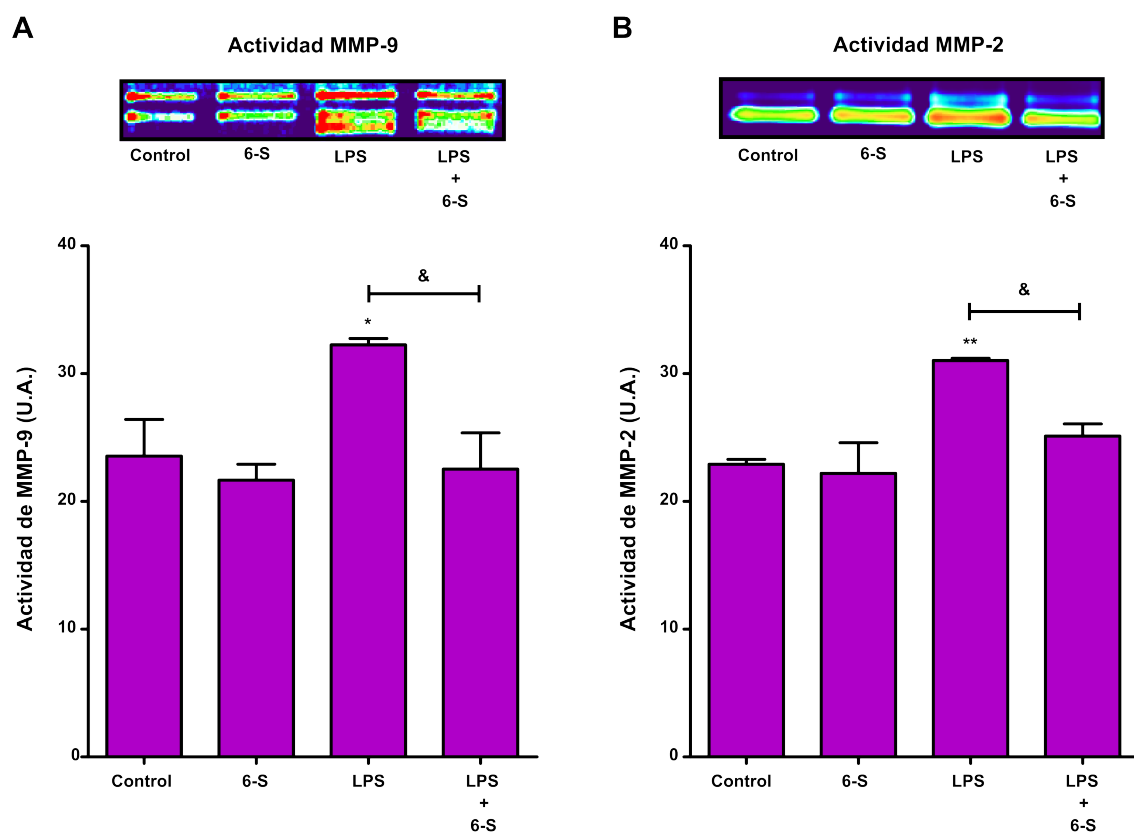


Figura 28. Estudio del efecto del 6-shogaol (6-S) sobre la actividad gelatinasa en las células ATDC5. Las células fueron cultivadas y, tras 18h de privación de FBS, fueron tratadas con 1µg/ml de LPS durante 24h, con o sin pre-incubación con 5µM de 6-S durante 1h. El medio de cultivo fue utilizado para estudiar la actividad gelatinasa mediante zimografía. (A) Actividad gelatinasa de la MMP-9. (B) Actividad gelatinasa de la MMP-2. Datos expresados como media±error estándar de la media de al menos 3 experimentos independientes. \*p<0,05 y \*\*p<0,01 vs control; &p<0,05 vs LPS.

#### **4.3. El 6-S tiene actividad anti-inflamatoria y anti-catabólica en los condrocitos primarios humanos**

Para confirmar el efecto anti-inflamatorio del 6-S, se estudió su efecto sobre la inducción de la producción del óxido nítrico en los condrocitos primarios humanos. Los resultados confirmaron la capacidad de este compuesto para reducir la respuesta inflamatoria estimulada por el LPS en estas células (Figura 29A).

Por otro lado, teniendo en cuenta que los derivados del jengibre como son los shogaoles y los gingeroles presentan similitudes estructurales con los inhibidores de la catepsina K, decidimos estudiar la potencial capacidad inhibitoria de la actividad de esta enzima por el 6-S en los condrocitos humanos mediante un ensayo de actividad con un sustrato de la catepsina K que da lugar a un producto fluorescente tras ser catabolizado. Los resultados mostraron que el compuesto 6-S fue capaz de inhibir la actividad de esta enzima (Figura 29B).

#### **4.4. La actividad anti-inflamatoria es independiente de la actividad anti-catepsina K en los compuestos derivados del jengibre**

Con la intención de determinar si las actividades anti-catepsina K y anti-inflamatoria estaban relacionadas, utilizamos un derivado semisintético del 6-S denominado SSi6 en el que se modificó el motivo estructural en el que está descrito que reside principalmente la actividad biológica del 6-S [214] (Figura 30A).

Tras seleccionar la dosis de 2,5µM del SSi6 en un ensayo de citotoxicidad (Figura 30B), se procedió a estudiar el efecto anti-inflamatorio de este compuesto en las células ATDC5, encontrando que este compuesto no afecta a la inducción por la IL-1β y el LPS de la producción del óxido nítrico ni de la expresión de la IL-6 y la MCP-1 (Figura 30C-E). Sin embargo, la actividad anti-catepsina K en los condrocitos primarios humanos se mantuvo tras las modificaciones estructurales, siendo incluso más acentuada para este compuesto que para el 6-S (Figura 29B). Del mismo modo, un potente inhibidor de catepsinas como es el E-64 fue capaz de inhibir la actividad de la catepsina K (Figura 29B) mientras que no fue capaz de inhibir la producción del óxido nítrico en los condrocitos tras la activación de la señalización de la IL-1β o del TLR4 (Figura 31).

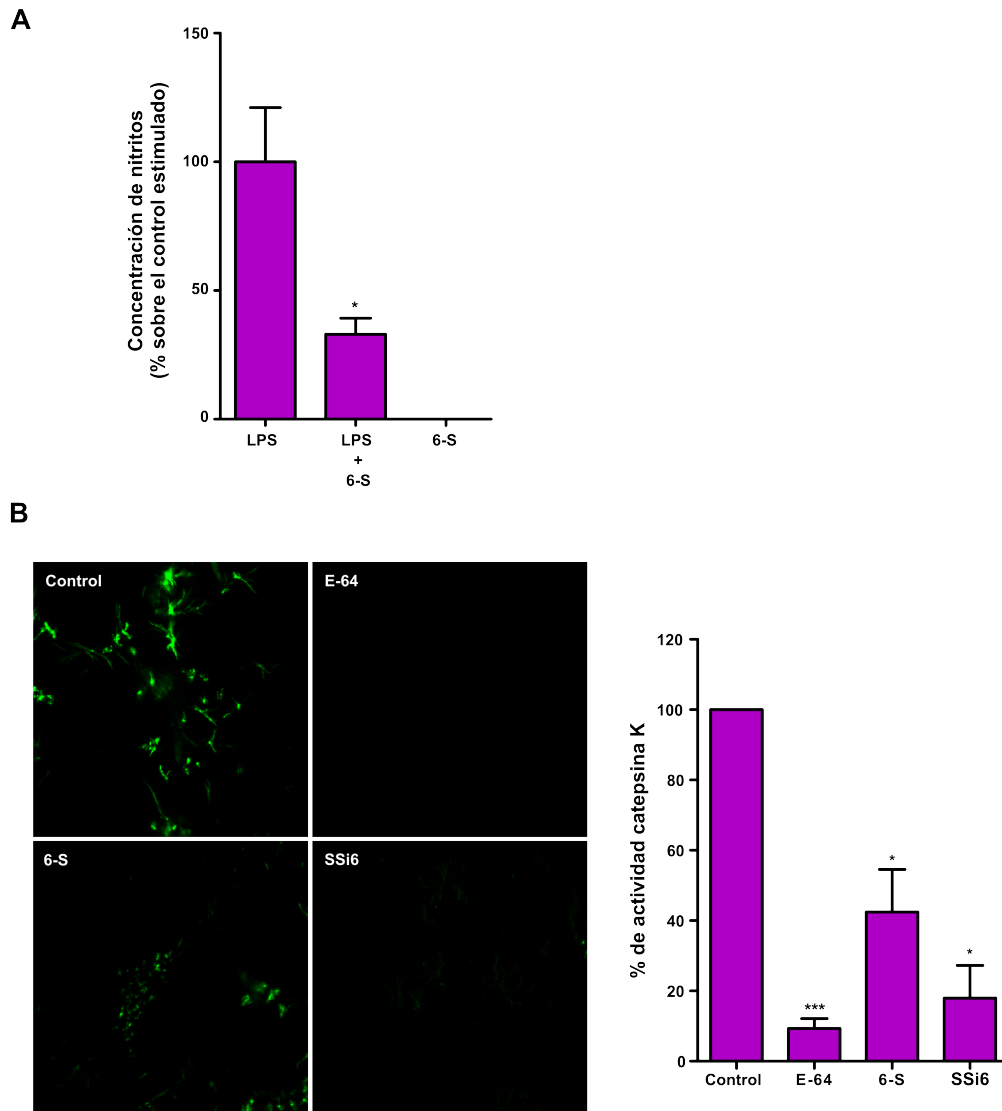


Figura 29. Estudio del efecto del 6-shogaol (6-S), del derivado semisintético SSi6 y del inhibidor de catepsinas E-64 sobre los condrocitos primarios humanos. (A) Las células fueron cultivadas y, tras 18h de privación de FBS, fueron tratadas con 1 $\mu$ g/ml de LPS durante 72h, con o sin pre-incubación con 5 $\mu$ M de 6-S durante 1h. A continuación fue medida la producción de nitritos en el medio de cultivo de las células. (B) La actividad catepsina K fue estudiada en los condrocitos humanos mediante la incubación de las células con el E-64, el 6-S o el SSi6 en presencia de un sustrato de la catepsina K fluorogénico. La actividad enzimática se evaluó por cuantificación de la cantidad de cristales fluorescentes. Datos expresados como media $\pm$ error estándar de la media de al menos 4 experimentos independientes. \* $p$ <0,05; \*\*\* $p$ <0,001.



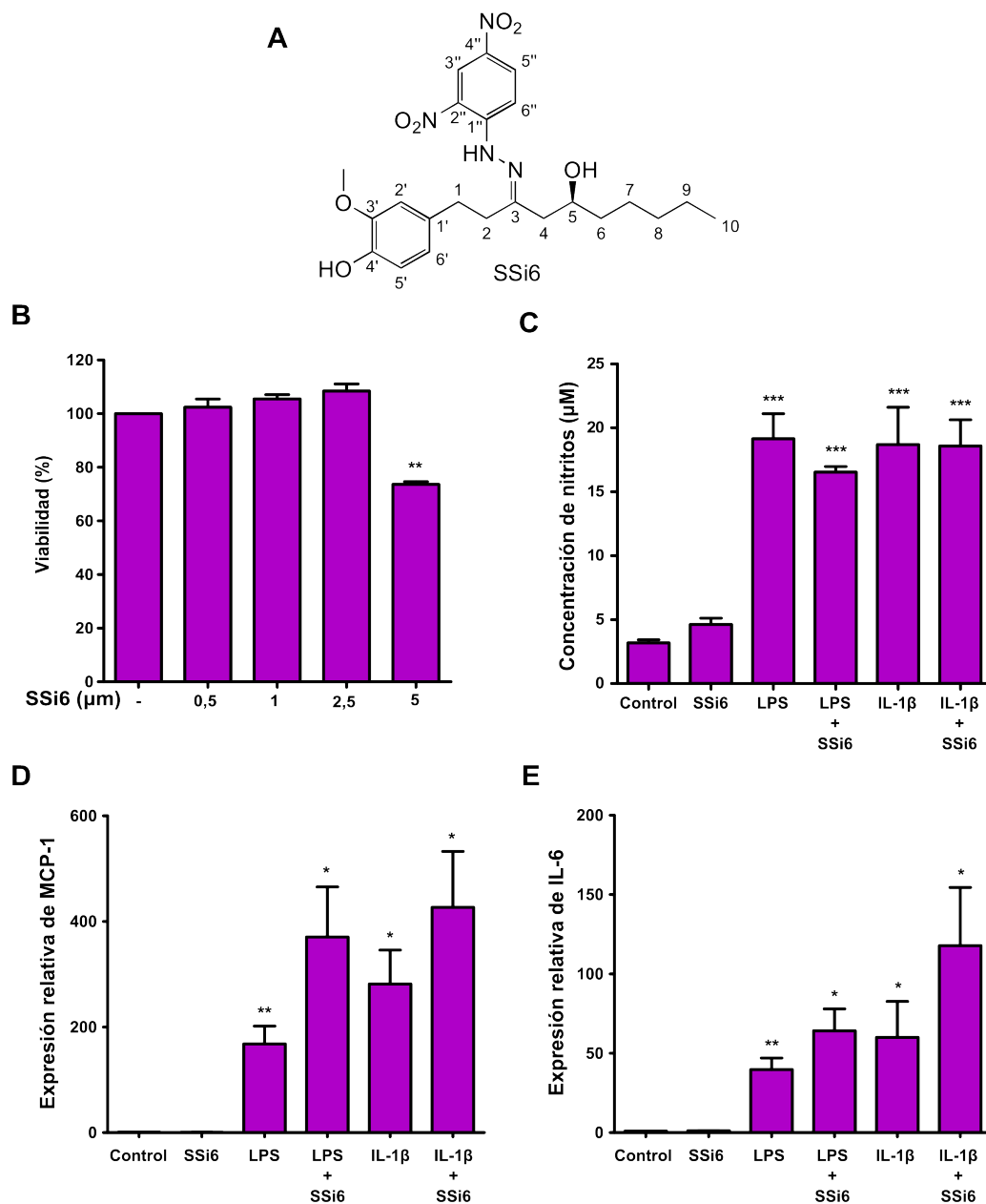


Figura 30. Estudio del efecto del derivado semisintético SSi6 en las células ATDC5. Las células fueron cultivadas y, tras 18h de privación de FBS, fueron tratadas con 1ng/ml de IL-1β o 1μg/ml de LPS durante 24h, con o sin pre-incubación con el SSi6 durante 1h. (A) Estructura del compuesto SSi6 (B) Estudio del efecto de diferentes concentraciones del SSi6 sobre la viabilidad celular. (C) Estudio del efecto de 2,5μM de SSi6 sobre la producción de nitritos en el medio de cultivo de células tratadas con la IL-1β o el LPS. (D) Estudio del efecto de 2,5μM de SSi6 sobre la expresión génica de la MCP-1 en células tratadas con la IL-1β o el LPS. (E) Estudio del efecto de 2,5μM de SSi6 sobre la expresión génica de la IL-6 en células tratadas con la IL-1β o el LPS. Datos expresados como media±error estándar de la media de al menos 3 experimentos independientes. \*p<0,05, \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001 vs control.

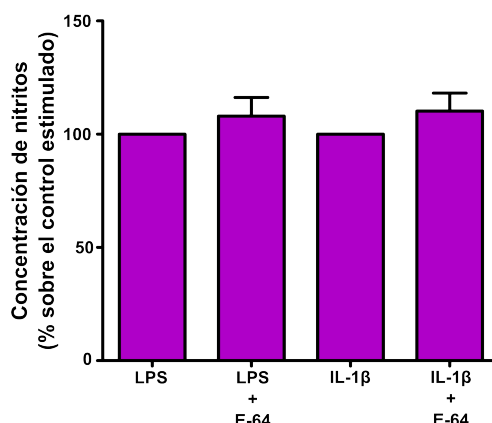


Figura 31. Estudio del efecto del inhibidor de catepsinas E-64 sobre la producción de óxido nítrico en las células ATDC5. Las células fueron cultivadas y, tras 18h de privación de FBS, fueron tratadas con 1ng/ml de IL-1β o 1μg/ml de LPS durante 24h, con o sin pre-incubación con el E-64 durante 1h. La concentración de nitritos fue medida en el medio de cultivo. Datos expresados como media±error estándar de la media de al menos 3 experimentos independientes.

Los estudios de inhibición enzimática determinaron que el SSi6 es un inhibidor parcialmente no competitivo, mientras que el 6-S es completamente acompetitivo. Las constantes de inhibición confirmaron que el SSi6 posee una mayor actividad anti-catepsina K que el 6-S (Tabla 3).

Tabla 3. Tipo de inhibición de la actividad de la catepsina K y constantes de inhibición para los compuestos derivados del jengibre.

Compuesto	Tipo de inhibición	$\alpha.K_i$ (μM)	$K_i$ (μM)
6-S	Completamente acompetitivo	16,65	-
SSi6	No competitivo parcial	0,75	10,47

## **V. DISCUSIÓN**

En esta tesis se ha realizado una investigación sistemática en la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas para la OA desde dos perspectivas diferentes.

En primer lugar, una visión esencialmente fisiopatológica ha permitido abordar dos campos relevantes en el desarrollo y evolución de esta patología como son el déficit estrogénico y la obesidad. Los resultados de este trabajo han mostrado que no existe síntesis local de estrógenos en el cartílago articular humano de mujeres menopáusicas debido a la ausencia de la enzima aromatasa, actuando este tejido como una diana para el efecto de estas hormonas pero sin participar activamente en su producción. Por otro lado, hemos determinado que una adipocina como la LCN2 se encuentra inversamente asociada a la diferenciación osteoblástica, además de presentar propiedades catabólicas tanto en los osteoblastos como en los condrocitos, pudiendo presentar un papel relevante en los procesos degenerativos que estarían teniendo lugar en la unión osteocondral durante la OA.

En una segunda aproximación, esta tesis se ha dirigido hacia la búsqueda de compuestos con potencial efecto terapéutico sobre diferentes tejidos articulares involucrados en la evolución de la OA. En este sentido, hemos encontrado que la administración intermitente de la PTH[1-34] en conejos OPOA reduce la sinovitis crónica asociada a esta enfermedad, además de mejorar la calidad ósea y la estructura del cartílago como ya había sido previamente publicado. Del mismo modo, también hemos determinado que un componente natural del jengibre como es el 6-S presenta actividad anti-inflamatoria además de anti-catabólica en condrocitos de ratón y de pacientes con OA, inhibiendo la actividad de las enzimas MMP-2, MMP-9 y cathepsina K, lo que le confiere un efecto dual, con una acción no sólo en el cartílago sino también en el hueso subcondral.

## 1. Estudio de la síntesis local de estrógenos en el cartílago

La alta prevalencia de OA en mujeres menopáusicas ha impulsado los estudios para analizar esta relación, demostrándose un efecto protector de los estrógenos sobre el cartílago articular [156]. Una vez establecido el déficit estrogénico que acompaña a la menopausia, muchos tejidos del organismo son capaces de sintetizar, localmente, cantidades significativas de estrógenos. Este aspecto se encuentra escasamente estudiado en el cartílago tanto de mujeres sanas como con OA. Por ello, y debido a la relevancia que podría tener este sistema durante el desarrollo de la OA, hemos estudiado la expresión y actividad de la enzima aromatasa tanto en el cartílago como en los condrocitos cultivados provenientes de mujeres postmenopáusicas con OA.

Mientras que los condrocitos humanos de pacientes con OA, cultivados hasta confluencia en condiciones de privación estrogénica, presentaron expresión y actividad aromatasa, la expresión de esta enzima apenas fue detectada en el cartílago articular tanto de individuos sanos como con OA. Es decir, los experimentos *in vitro* no concuerdan con los hallazgos encontrados en las muestras estudiadas *ex vivo*. El estudio de la expresión a lo largo del tiempo de cultivo mostró que los condrocitos recién aislados mantuvieron una expresión mínima de la enzima aromatasa, siendo ésta inducida tras sólo dos días en cultivo y permaneciendo elevada los posteriores días de estudio.

De acuerdo con estos resultados, experimentos en otros sistemas como trofoblastos humanos han mostrado que la expresión de la aromatasa aumenta tras el aislamiento de las células y su posterior cultivo [94]. Del mismo modo, la expresión y actividad de la aromatasa ha sido detectada en los condrocitos de ratas cultivados hasta alcanzar la confluencia [197, 198], aunque no se ha encontrado en los condrocitos cultivados de conejo [15]. Los diferentes sistemas de medida, así como el hecho de tratarse de distintas especies, podría justificar las discrepancias entre estos trabajos. Respecto al cartílago, Bellino encontró que el cartílago articular de conejo no presenta actividad aromatasa [15]. Sin embargo, la expresión de la aromatasa ha sido detectada en la placa de crecimiento humana y de rata [62, 144]. La aromatasa juega un papel muy relevante en el crecimiento de los huesos largos, apareciendo su expresión incrementada durante la madurez sexual [62, 165]. Por tanto, las diferencias de expresión encontradas entre los estudios realizados

en placas de crecimiento y los trabajos en cartílago maduro podrían derivar de este papel fisiológico de la enzima. Muy recientemente, ha sido también descrita la expresión de la aromatasa en el cartílago humano mediante PCR convencional y *western blot* [168]. Sin embargo, la ausencia de una relativización frente a tejidos controles impide determinar la relevancia biológica de estos resultados. Todos estos estudios evidencian la complejidad de este sistema, en el que la diferente metodología seleccionada puede dar lugar a distintas conclusiones.

La transcripción del gen de la aromatasa está modulado por un sistema específico de cada tejido, con 6 promotores alternativos activados de forma diferencial en la mama, el hueso, el cerebro, la placenta, etc, así como en los tejidos sanos y enfermos [180]. En cambio, las células de un mismo origen mesenquimal como son los adipocitos y los OB parecen compartir mecanismos moduladores de la expresión génica de la aromatasa a través del promotor I.4. Esto sugiere que los condrocitos, también de origen mesenquimal, podrían compartir esta regulación [180].

Por otro lado, la transcripción de la aromatasa se ve incrementada en presencia de andrógenos como la testosterona en algunos tipos celulares [54]. Sin embargo, en este estudio no encontramos este efecto en los condrocitos cultivados, observando la misma expresión en presencia y ausencia de testosterona. De acuerdo con nuestros resultados, otros andrógenos como la dehidroepiandrosterona (DHEA), un precursor de la androstenediona, no son capaces de modular la expresión de la aromatasa en los condrocitos cultivados de rata [198], reflejando una vez más la compleja regulación de la transcripción de esta enzima.

Otros factores que han sido descritos como reguladores de la aromatasa son los estrógenos. De hecho, la privación de estrógenos por tiempos prolongados es capaz de inducir la actividad de esta enzima en las células MCF-7 [223]. El diseño experimental de nuestro trabajo implica la ausencia de actividad estrogénica para evitar posibles interacciones indeseadas con los estudios realizados. Con esta finalidad, los condrocitos fueron aislados y cultivados con medio de cultivo sin rojo fenol y con FBS tratado con carbón vegetal para eliminar las hormonas esteroideas presentes en el suero. Los inesperados resultados obtenidos en estas condiciones nos llevaron por tanto a estudiar si esta privación de estrógenos podía ser la causa de la inducción de la expresión de la

aromatasa en los condrocitos con respecto al cartílago. Sin embargo, en este estudio encontramos que la expresión de la aromatasa fue similar en presencia y en ausencia de estrógenos, por lo que pudimos descartar el mantenimiento de los condrocitos en unas condiciones extremas de falta de estrógenos como la causa de la inducción de la expresión de la aromatasa en nuestro sistema.

Durante el cultivo, los condrocitos son expuestos a un ambiente muy diferente a las condiciones *in vivo*. El cartílago es un tejido avascular, con un acceso limitado a los nutrientes e incluso al oxígeno [76, 211]. Por el contrario, las condiciones utilizadas habitualmente para el cultivo de los condrocitos en monocapa suponen un aporte ilimitado de nutrientes en condiciones de normoxia, lo cual condiciona el gasto energético y la actividad global metabólica de la célula. En este sentido, se ha demostrado que las concentraciones de oxígeno son capaces de modular la expresión y actividad de la aromatasa en los trofoblastos humanos [94]. Por tanto, son varios los factores que podrían contribuir a la sobreexpresión de la aromatasa en los condrocitos durante el cultivo en monocapa.

Además, en este modelo *in vitro*, los condrocitos sufren un proceso de desdiferenciación, disminuyendo la expresión de diversas moléculas relacionadas con el metabolismo del cartílago como son el COL2 y el agrecano [58, 69, 170]. Por ello, decidimos estudiar si la modulación de la expresión de la aromatasa en cultivo estaba relacionada con este proceso de desdiferenciación. La expresión de la aromatasa apareció inversamente correlacionada con la expresión del COL2, sugiriendo que el proceso de desdiferenciación podría estar relacionado con la inducción de la aromatasa. De hecho, diversos factores relacionados con la desdiferenciación de los condrocitos como la IL-1 [70, 135] y los glucocorticoides [68, 136] han sido descritos como inductores de la expresión de la aromatasa en los OB [180], sugiriendo que la expresión de la aromatasa y la desdiferenciación podrían compartir mecanismos reguladores. De acuerdo con otros estudios publicados [112], tras el cultivo de los condrocitos en esferas de alginato se obtuvo un incremento de los marcadores de diferenciación COL2 y agrecano. Sin embargo, la expresión de la aromatasa no se vio modificada por este sistema de cultivo, manteniéndose elevada. Estos resultados sugieren que el sistema de rediferenciación por cultivo en alginato no es eficaz para lograr la recuperación total del fenotipo del condrocito

maduro. Muchas vías regulatorias podrían estar interviniendo en la expresión de la aromatasa y la diferenciación condrocitaria, de forma que estos dos procesos compartan solo algunos de los efectos derivados de esta regulación.

**En resumen, en este trabajo hemos demostrado que el cartílago articular humano no es capaz de expresar la aromatasa de manera relevante durante la menopausia, y que el proceso de cultivo de los condrocitos modifica de forma sustancial el metabolismo estrogénico de estas células.** De acuerdo con trabajos anteriores [208], hemos podido detectar la presencia de los receptores de estrógenos en el cartílago humano OA mediante inmunohistoquímica. Este dato implica que los condrocitos articulares presentan la capacidad de responder a los estrógenos a pesar de que no puedan sintetizarlos. La expresión de aromatasa sí ha sido detectada en otros tejidos articulares como el hueso [85], así como en los sinoviocitos [12]. Estos datos permiten postular que las principales fuentes de estrógenos a nivel articular podrían ser la membrana sinovial y el hueso, mientras que el cartílago actuaría meramente como un receptor de estas hormonas.

Estos resultados suponen una gran relevancia práctica en el manejo terapéutico de la OA, ya que los estrógenos presentan un importante papel protector del cartílago. La ausencia de expresión de la aromatasa en este tejido permite descartar que la modulación farmacológica de la actividad de esta enzima, como puede ser el uso de inhibidores como el Letrozol, pueda tener un efecto directo sobre el metabolismo del cartílago, si bien sí podría afectar a la producción de estrógenos por otros tejidos articulares. Sin embargo, los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (*selective estrogen receptor modulators*, SERM), que actualmente están emergiendo como una potencial estrategia terapéutica para la OA [126], así como la terapia sustitutiva con estrógenos, sí podrían modular a la evolución del daño en el cartílago gracias al efecto anti-inflamatorio, anti-catabólico y anti-oxidante de los estrógenos sobre este tejido [46, 47, 155].

Por último, es necesario destacar que la expansión de las células en monocapa es un paso necesario para incrementar el número de células disponibles para la terapia de trasplante de condrocitos. La desdiferenciación que ocurre durante este proceso es un importante reto a combatir en este tipo de terapias, para lo cuál se utilizan diferentes estrategias como la utilización de factores de crecimiento o diferentes sustratos que permitan evitar o ralentizar esta pérdida de fenotipo de los condrocitos [44]. Sin embargo,



los resultados de este trabajo reflejan que, además de la desdiferenciación condrocitaria, el metabolismo de estrógenos se ve alterado durante el cultivo en monocapa de los condrocitos, lo cual puede mantenerse en fases posteriores. Diversos procesos metabólicos podrían alterarse además del metabolismo estrogénico estudiado en este trabajo. Esta situación sería un importante factor a tener en cuenta en este tipo de terapias, ya que las células utilizadas en los sistemas de trasplante de condrocitos podrían presentar aberraciones metabólicas determinantes para su correcto comportamiento *in vivo*.

## **2. Estudio del papel de la LCN2 en el metabolismo de los osteoblastos**

El reciente concepto de la OA como un fracaso orgánico de toda la articulación ha estimulado el estudio de los distintos tejidos que la componen y de los mecanismos moleculares involucrados, especialmente en la unidad funcional formada por el cartílago articular y el hueso subcondral. En el hueso OA, la carga mecánica anómala se ha asociado a la modulación de la expresión de genes mecano-sensibles, incluyendo factores de crecimiento óseo como el TGF $\beta$  [19]. Este proceso ha sido vinculado con la formación ósea aberrante, que a su vez altera la biomecánica osteocondral [228].

Las adipoquinas son moléculas altamente pleiotrópicas que han sido relacionadas con la regulación de diversos procesos clave en múltiples sistemas. De esta manera, se ha visto que determinadas adipoquinas desempeñan un importante papel en la fisiopatología de la OA, potenciando el ambiente inflamatorio y catabólico articular asociado a la obesidad y el síndrome metabólico [152, 229]. En este sentido, la LCN2 ha sido descrita como una adipoquina mecano-sensible con actividades catabólicas en distintos tejidos articulares [79, 174]. Sin embargo, pese a que la LCN2 es la molécula cuya expresión aparece más aumentada en los OB en ausencia de carga mecánica [31], su papel en el metabolismo óseo no ha sido estudiado en profundidad. Motivo por el cual decidimos estudiar la regulación de la LCN2 en el metabolismo de los OB y su potencial papel en la unión osteocondral.

Durante la diferenciación osteoblástica, la expresión génica de la LCN2 disminuyó, en paralelo con un aumento de los marcadores de diferenciación. Acorde con esto, un estímulo catabólico para el hueso como la Dx, que en concentraciones superiores a 1 $\mu$ M tiene la capacidad de inhibir la diferenciación osteoblástica de las células MC3T3 [111, 127, 185], indujo un aumento de la expresión de la LCN2 acompañado también de una disminución de un marcador de diferenciación como la FA. Estos resultados sugieren la vinculación de la expresión de la LCN2 con el grado de diferenciación de los OB. En este sentido, la expresión de esta adipoquina se ha visto modulada en la diferenciación de otros tipos celulares con el mismo origen mesenquimal, como son los adipocitos y los condrocitos [51, 222, 225]. Sin embargo, en estos tipos celulares, al contrario de lo que

observamos en los OB, la expresión de la LCN2 se correlaciona positivamente con el proceso de diferenciación. Cabe destacar que los procesos de adipogenesis y osteoblastogenesis están descritos como procesos antagónicos, dado que el compromiso de los progenitores en la diferenciación hacia una de estas líneas celulares bloquea el desarrollo de la otra. Así, se ha podido comprobar como moléculas implicadas en ambos procesos tienen efectos opuestos [16, 92, 159]. Por lo tanto, la diferente modulación de la LCN2 a lo largo de la diferenciación mesenquimal podría ser consecuencia de la relación inversa que existe entre estos dos procesos excluyentes: osteoblastogénesis y adipogénesis. No obstante, pese a que la LCN2 parece estar relacionada con la diferenciación osteoblástica, ni la sobreexpresión transitoria ni la adición exógena de esta adipoquina modificó los marcadores de diferenciación en los OB.

La expresión de la LCN2 se encuentra incrementada en los OB en presencia de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-17 y el TNF [176]. Otros factores pro-inflamatorios, entre ellos la IL-1 $\beta$  y agonistas del TLR4 como el LPS, han sido descritos como estimuladores de la expresión de la LCN2 en otros tipos celulares [37, 51, 225]. Además, la carga mecánica es capaz de inducir la síntesis de diversos mediadores pro-inflamatorios, siendo éstos responsables de los procesos inflamatorios y catabólicos que ocurren durante la evolución de la OA [35, 75, 162, 207]. Acorde con estos datos, pudimos observar que, tanto en los OB humanos como en las células MC3T3, la activación de la señalización del receptor de la IL-1 $\beta$  y del TLR4 promueven la expresión de la LCN2. Además de estas propiedades como mediadora de respuestas inflamatorias, también han sido atribuidos a la LCN2 efectos deletéreos sobre el hueso en un estudio en ratones con sobreexpresión de la LCN2 en el hueso, los cuales presentaban huesos de baja calidad y de menor tamaño que los animales controles [55].

Tanto la ausencia de carga mecánica [31] como los factores pro-inflamatorios estudiados en este trabajo, inducen un aumento de la expresión de la LCN2, y ambas situaciones derivan en efectos deletéreos para el hueso. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales actúa la LCN2 no son bien conocidos. Está ampliamente reconocida su capacidad para transportar el hierro a través de la membrana plasmática, con el resultado tanto de depleción como de acumulación de hierro intracelular en función del estado en el que se encuentre la LCN2 [60], así como su papel estabilizador de la MMP-9 en el líquido

sinovial y en la orina [79, 221]. En cambio, otras funciones como su efecto sobre la supervivencia celular no están tan claras, con trabajos mostrando que su papel podría ser específico del tipo celular sobre el que actúe [100]. En este trabajo, no hemos encontrado un efecto directo de la LCN2 sobre la diferenciación o la viabilidad de los OB. Sin embargo, el medio enriquecido en LCN2 fue capaz de incrementar la inhibición de la vitalidad de los OB por el hierro y de estabilizar la actividad de la MMP-9. El hierro está descrito como un inhibidor de la vitalidad y la diferenciación de los OB [132, 220]. En consecuencia, nuestros resultados sugieren que la LCN2 podría tener un papel relevante en estos efectos deletéreos del hierro sobre el hueso, al incrementar el transporte de este ion al interior celular y por tanto disminuir la vitalidad de los OB. De hecho, la estabilización de la enzima MMP-9 por la LCN2 también supone una propiedad importante de esta adipocina en el metabolismo óseo y en la patogenia de la OA, ya que esta proteasa participa en la degradación del cartílago [120, 182] pero también en el remodelado óseo, habiéndose incluso propuesto un importante papel para la MMP-9 en la diferenciación osteoclástica [97]. Por tanto, ambos resultados sugieren que la LCN2 podría actuar en el hueso como un agente con propiedades catabólicas muy relevantes.

La información publicada hasta el momento acerca de la regulación de la LCN2 en los OB es escasa. Como se ha indicado anteriormente, es destacable el trabajo de Capulli y colaboradores [31] en el que describen la LCN2 como el gen mecano-sensible cuya expresión aparece más incrementada en los OB en condiciones equivalentes a la ausencia de carga mecánica. La carga mecánica presenta un efecto anabólico sobre el hueso [43, 88, 158], mientras que su ausencia, en situaciones tales como microgravedad o largos periodos de tiempo de inmovilización, conlleva una pérdida de masa ósea [32, 50]. En este efecto anabólico de la estimulación mecánica se encuentran involucradas distintas citoquinas y factores de crecimiento, como el TGF $\beta$  y el IGF-1, que están relacionados con la formación ósea [19, 110, 153, 162]. Estos factores son importantes en la progresión de la OA, que es caracterizada por un aumento del remodelado óseo. Este proceso implica la liberación de estos factores de crecimiento óseo y la generación de la escleritis del hueso subcondral característica de los estados avanzados de la enfermedad. Por tanto, en la OA existe tanto una alta producción del TGF $\beta$  como una mayor activación y liberación de este factor debido a la elevada actividad osteoclástica [57, 142, 181, 228]. La aparición de

hueso esclerótico produce alteraciones en la biomecánica articular, generando zonas con diferente carga que presentan distintas propiedades, no sólo mecánicas si no también moleculares. Recientemente, Sánchez y colaboradores describieron que los OB procedentes del hueso subcondral esclerótico muestran una capacidad mecano-sensible reducida, mientras que los OB del hueso subcondral no esclerótico aumentan la expresión de genes relacionados con el proceso esclerótico ante un estímulo mecánico [162]. Esta compleja relación entre componentes mecánicos y moleculares tiene un importante papel en la relación entre el hueso subcondral y el cartílago articular durante el desarrollo de la OA [84, 125]. Por este motivo, resulta interesante el estudio del TGF $\beta$  y el IGF-1 como potenciales mediadores de la modulación de la expresión de la LCN2 por factores biomecánicos y moleculares. De acuerdo con este modelo, nuestros resultados mostraron que la incubación con dichos factores de crecimiento, incrementados ante la compresión mecánica en el hueso o por un aumento del remodelado óseo, reduce de forma significativa la expresión de la LCN2 promovida por estímulos pro-inflamatorios en los OB humanos.

Tanto el IGF-1 como el TGF $\beta$  actúan en el metabolismo óseo regulando la formación de hueso [11, 177, 226]. Ambos factores intervienen en la diferenciación osteoblástica y, aunque sus efectos tienen lugar en diferentes estadios, presentan principalmente efectos anabólicos. Por un lado, el TGF $\beta$  participa en estados tempranos del proceso, promoviendo la proliferación celular y el compromiso de las células progenitoras hacia la línea osteoblástica [131]. En cambio, el IGF-1 posee un importante papel sobre el proceso de mineralización de la matriz ósea en estados más avanzados de la diferenciación [177, 213]. Las propiedades anabólicas de estos factores en la diferenciación osteoblástica apoyan el papel catabólico de la LCN2 en este proceso, al ser capaces de inhibir su expresión. De esta forma, el aumento de la carga mecánica podría promover la esclerosis del hueso subcondral por dos mecanismos: 1) inhibición de la síntesis de la LCN2 y 2) aumento de la producción de TGF $\beta$  e IGF-1, que a su vez reducen la expresión de la LCN2. Al contrario de lo que ocurre en el caso del IGF-1, el TGF $\beta$  redujo completamente la inducción de la LCN2, además de disminuir su expresión basal. Durante la osteoblastogénesis, la mayor reducción en la expresión de la LCN2 ocurrió durante las primeras etapas del proceso, en cuya regulación el TGF $\beta$  posee mayor relevancia que el IGF-1, lo que podría explicar el hecho de que el TGF $\beta$  presente un efecto más significativo

en la inhibición de la expresión de la LCN2.

Como se ha indicado, la interacción entre el hueso subcondral y el cartílago articular posee un importante componente mecánico. Sin embargo, también existe una interacción bioquímica, en la que se produce un intercambio de moléculas entre ambos tejidos que participan de una forma relevante en el desarrollo de la OA [211, 227]. Tanto los condrocitos como los OB del hueso subcondral se encuentran expuestos a diversos estímulos que pueden actuar sobre la normal relación osteocondral. Entre ellos destacan factores pro-inflamatorios provenientes de tejidos articulares inflamados como la membrana sinovial [166, 167] o del propio hueso sometido a un exceso de carga mecánica [162]. Por este motivo, continuando con la relación de la LCN2 con la unidad osteocondral, se realizó un estudio mediante una aproximación *in vitro* utilizando medios condicionados de condrocitos y OB primarios humanos pre-estimulados. El medio condicionado por OB pre-estimulados indujo un aumento de la expresión de la LCN2 en condrocitos, mientras que no hubo efecto en el caso contrario. Este hecho sugiere que, aunque potencialmente bidireccional, la comunicación bioquímica en el caso de la modulación de la LCN2 podría predominar en la unión osteocondral en el sentido OB-condrocito. De hecho, diversos trabajos han sugerido este tipo de relación [30, 161, 215].

En ausencia de carga mecánica, el cartílago articular sufre un proceso de atrofia con un estrechamiento progresivo de su grosor [209]. Al igual que en el hueso, la señalización por el TGF $\beta$  es un importante mediador de la mecanotransducción en los condrocitos [26, 137]. Este factor de crecimiento promueve la proliferación y diferenciación condrocitaria, aunque inhibe el proceso de diferenciación terminal y la mineralización, lo que ocurre de forma fisiológica durante la formación del cartílago articular normal [106]. Sin embargo, la señalización por estas moléculas anabólicas puede verse reducida en los condrocitos por diferentes motivos. Ha sido descrito que el envejecimiento y el estrés oxidativo son capaces de reducir la señalización del TGF $\beta$  y el IGF-1 en los condrocitos [21, 123]. Además, la diferenciación terminal de los condrocitos hasta el estado hipertrófico ha sido asociada a una inhibición de la señalización por el TGF $\beta$  [205]. De hecho, la pérdida de señalización por el TGF $\beta$  en los condrocitos conlleva la desaparición de su efecto protector sobre el cartílago y predispone al desarrollo de la OA [22, 175]. Recientemente, ha sido descrito que durante el envejecimiento la señalización del TGF $\beta$  en el cartílago ocurre a

través de su receptor ALK1, con propiedades deletéreas en este tejido, además de su receptor canónico ALK5, que media los efectos protectores [103]. Por tanto, a pesar de las potenciales propiedades beneficiosas sobre el cartílago de la producción del IGF-1 y del TGF $\beta$  por el hueso, en el tejido de edad avanzada estos efectos desaparecen y la producción de estos factores de crecimiento por el hueso podría incluso contribuir al desarrollo de la OA.

El IGF-1 y el TGF $\beta$  producidos por el hueso o por el propio cartílago pueden actuar por tanto sobre las células del cartílago a través de un mecanismo complejo en un entorno pro-inflamatorio como es la OA. Puesto que está descrito que la LCN2 tiene un papel catabólico en el cartílago, donde es modulada por este ambiente pro-inflamatorio, realizamos un estudio para determinar el efecto del IGF-1 y el TGF $\beta$  sobre la inducción de la expresión de la LCN2 por la IL-1 $\beta$  y por la activación del TLR4. La activación de estas vías pro-inflamatorias en el cartílago podría provenir o ser consecuencia tanto del entorno inflamatorio de la articulación artrósica como del hueso subcondral alterado por este mismo ambiente y por las modificaciones de la carga mecánica, en los condrocitos humanos. El resultado fue una inhibición de la inducción por la IL-1 $\beta$ , e incluso por la activación del TLR4 en el caso del TGF $\beta$ . La LCN2 ha sido descrita como un factor catabólico en el cartílago, apareciendo su expresión incrementada durante la OA [224]. Diversos trabajos han descrito la modulación de su expresión en los condrocitos por factores deletéreos para el cartílago [51, 74, 143]. Además, la incubación de explantes de cartílago con LCN2 aumenta la degradación de la matriz tisular por liberación de GAGs [79]. De este modo, la LCN2 muestra propiedades catabólicas en el cartílago artrósico, y los factores IGF-1 y TGF $\beta$  exhiben un papel protector frente al avance de la OA en el cartílago. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, diversas circunstancias pueden conducir a una alteración en la señalización de estas moléculas, perdiendo la inhibición de la expresión de la LCN2 y otras propiedades beneficiosas y pudiendo incluso colaborar al daño articular. Así, muchos son los factores que afectarán a la regulación de la expresión de la LCN2 en el cartílago: 1) las diferentes zonas de carga, 2) la aparición de núcleos de condrocitos de tipo hipertrófico, 3) el envejecimiento y el estrés oxidativo, 4) la inflamación local. Del mismo modo, el aumento de la adipogénesis en la médula ósea con la edad, así como el aumento de la producción de adipocinas y la inflamación crónica de

bajo grado asociados a la obesidad, podrían también estar modulando la expresión y el efecto de la LCN2 tanto en el hueso subcondral como en el cartílago articular. De esta forma, podría existir un complejo fenotipo en el que la expresión de la LCN2 en el hueso y el cartílago presentaría una gran variabilidad tanto entre individuos como entre diferentes áreas de la articulación de un mismo paciente (Figura 32).

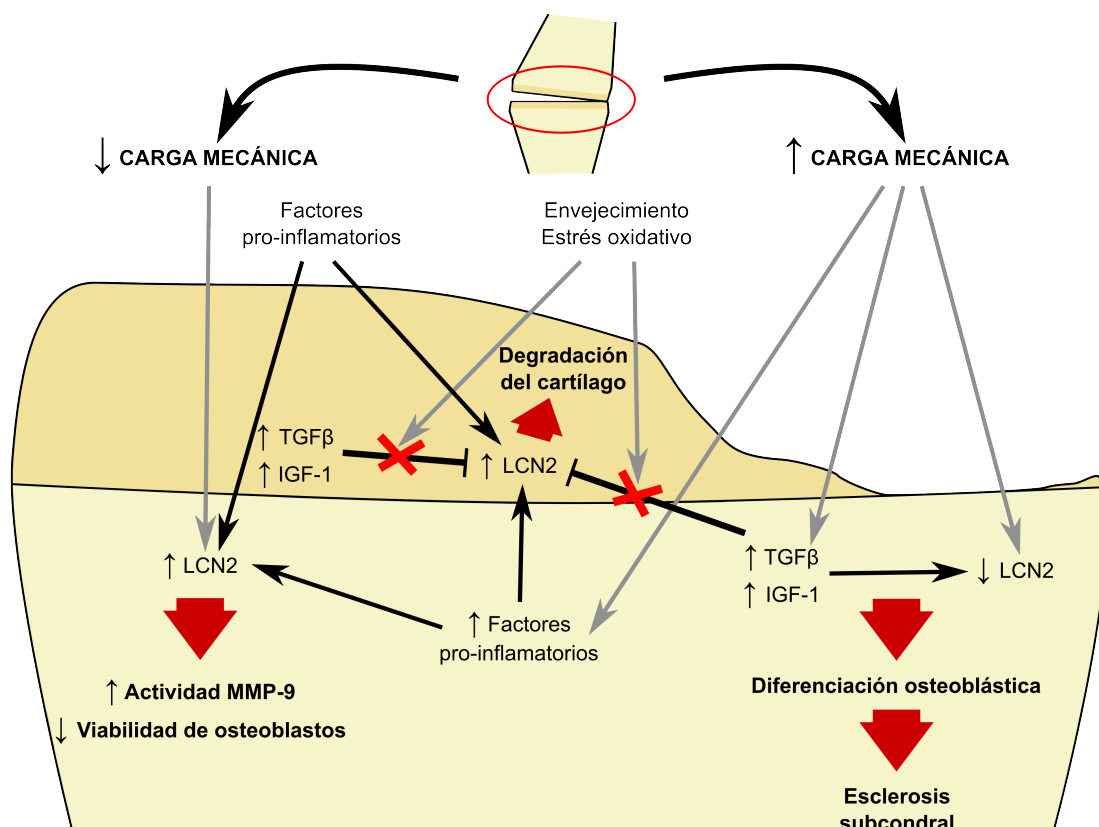


Figura 32. Esquema representativo del posible papel de la lipocalina 2 (LCN2) en la unión osteocondral durante el desarrollo de la artrosis. Ante alteraciones en la biomecánica articular, los tejidos de la articulación son sometidos a diferentes cargas mecánicas. En las zonas expuestas a un aumento de la carga, la expresión de la LCN2 aparece reducida, junto con un aumento de la expresión de factores como el TGF $\beta$  y el IGF-1 que a su vez contribuyen a reducir la expresión de la LCN2, produciendo un aumento de la diferenciación osteoblástica que deriva en una mayor formación ósea y el desarrollo de esclerosis subcondral. En las zonas con menor estrés mecánico, se produce un aumento de la expresión de la LCN2 tanto por la ausencia de carga mecánica como por factores pro-inflamatorios provenientes del entorno articular inflamado y de los osteoblastos de zonas próximas en los que existe una mayor carga. Este aumento de la LCN2 en los osteoblastos tiene consecuencias deletéreas para el hueso por sus efectos sobre la estabilidad de la MMP-9 y la viabilidad de los osteoblastos. A su vez, factores pro-inflamatorios provenientes del hueso o de otros tejidos articulares, así como otros posibles mediadores sintetizados por el hueso subcondral alterado, inducen la expresión de la LCN2 en el cartílago articular. A pesar de que el TGF $\beta$  y el IGF-1 podrían revertir esta inducción, la alteración de su señalización ante estrés oxidativo, envejecimiento, etc. podría ser responsable de la colaboración de estos factores al daño tisular en los condrocitos artróticos. Flechas grises: datos previamente publicados. Flechas negras: datos aportados por esta tesis.



**En resumen, estos resultados sugieren que la LCN2 es un importante factor catabólico en el metabolismo de los osteoblastos, regulado por factores pro-inflamatorios/catabólicos y por la relación entre el cartílago y el hueso subcondral. Así, esta adipoquina podría tener un papel relevante en el desarrollo de los cambios en la estructura ósea presentes en la OA así como un efecto deletéreo adicional en el cartílago artrósico, mediado por las alteraciones en el hueso subcondral. De esta forma, participaría en la patogenia global de la enfermedad, estando presente tanto en la vertiente mecánica como en la metabólica y catabólica. Por tanto, la LCN2 surge como una posible diana terapéutica para frenar el avance de la OA, así como para detener las alteraciones óseas y el deterioro del cartílago articular.**

### **3. Estudio del efecto del tratamiento con la PTH[1-34] sobre la inflamación sinovial asociada a la OA**

Nuestro grupo ha demostrado previamente que el tratamiento con la PTH[1-34] mejora la calidad del hueso subcondral y a la vez reduce el daño en el cartílago articular en un modelo de conejo de OA agravada por OP [14]. De esta forma, la PTH[1-34] se trata de un fármaco que podría tener múltiples dianas en la articulación OA. Por este motivo, es interesante determinar el efecto del tratamiento con la PTH[1-34] sobre otra importante característica de la OA como es la sinoviopatía que aparece en esta enfermedad, utilizando el mismo modelo animal.

Como indicamos anteriormente, las fases avanzadas de la OA se acompañan con frecuencia de una sinovitis crónica, lo cual constituye además un factor de mal pronóstico de la enfermedad [10, 141]. Esta sinoviopatía está caracterizada por hiperplasia y proliferación de las células de la capa íntima, fibrosis y un leve infiltrado de células inmunes, así como la producción de mediadores pro-inflamatorios y catabólicos que agravan el daño a otros tejidos articulares [124].

Los conejos OPOA presentaron una sinovitis significativa, con hiperplasia de la capa íntima, angiogenesis, fibrosis e inducción de algunos mediadores como la MCP-1 y la MMP-13. Estas alteraciones son similares a las que encontradas en otros modelos animales de OA [184], y a la sinoviopatía presente en algunos pacientes con esta enfermedad [186].

El estudio histopatológico de las membranas sinoviales mostró que el tratamiento con la PTH[1-34] redujo la hiperplasia de la capa íntima y las alteraciones en la matriz, así como la afectación total de la membrana sinovial. Del mismo modo, el grado de fibrosis y la inducción de mediadores inflamatorios y catabólicos también se vieron reducidos tras el tratamiento. Sin embargo, este tratamiento no afectó a la presencia de infiltrado inflamatorio. Es destacable que la presencia de infiltrado celular en las membranas sinoviales de los animales OPOA fue muy reducida, no encontrándose diferencias en la mayoría de las muestras examinadas. Estos resultados sugieren que en la sinoviopatía de los conejos OPOA los principales factores contribuyentes a la patología son la proliferación de la capa íntima, la fibrosis y el aumento de vasos sanguíneos. Estos resultados también justifican la ausencia de efecto del tratamiento con la PTH[1-34] sobre

el infiltrado inflamatorio.

La MCP-1 y la MMP-13 son dos importantes mediadores del daño tisular en la OA. La MCP-1 está implicada en el reclutamiento y la activación de los monocitos en la membrana sinovial [119], mientras que la MMP-13 promueve la degradación de la matriz de los diferentes tejidos articulares [138]. La expresión de la MCP-1 en la membrana sinovial ha sido estudiada en pacientes con AR, donde el grado de inflamación sinovial es mayor que en la OA. En estos pacientes, la MCP-1 es principalmente sintetizada por los FS de la capa íntima y por las células endoteliales de los vasos en la membrana sinovial [82]. Por tanto, la hipertrofia de la capa íntima y el aumento de las estructuras vasculares en las membranas sinoviales de los conejos OPOA podría justificar el aumento de expresión de esta citoquina. Ha sido descrito que el efecto anabólico de la PTH[1-34] sobre el hueso es mediado por un aumento en la expresión de la MCP-1 en los OB y los osteocitos, que conlleva un incremento en el número de OC y de la tasa de remodelado con un efecto final de aumento de la masa ósea [199]. Sin embargo, en este trabajo observamos una disminución de la MCP-1 en la membrana sinovial de los conejos OPOA tratados con la PTH[1-34]. Como se ha indicado, las principales células productoras de la MCP-1 en este tejido se encuentran en la capa íntima y en los vasos sanguíneos. Por tanto, la reducción en la angiogenesis y en el número de FS de la capa íntima tras el tratamiento con la PTH[1-34] podría ser la causa de la menor expresión de la MCP-1, con una disminución global de su expresión en el tejido total, sin implicar una disminución de la expresión en las propias células.

En el caso de la MMP-13, la reducción de su expresión por el tratamiento en los animales OPOA posee una alta implicación en el desarrollo de la OA. La MMP-13 contribuye a la degradación de la matriz del cartílago, suponiendo un importante factor en el progreso del daño articular. De hecho, los animales deficientes en esta enzima presentan protección frente al desarrollo de la OA [121]. Del mismo modo, la sobreexpresión de la MMP-13 en el cartílago genera un daño articular similar al encontrado en la OA [138]. Por tanto, el efecto inhibitor de la PTH[1-34] sobre la expresión de esta molécula podría ser clave para la evolución de esta patología. De acuerdo con nuestros datos en la membrana sinovial, ha sido descrito que el tratamiento con la PTH[1-34] reduce la expresión de la MMP-13 en el cartílago de los ratones con OA [160].

Además de la inhibición de la expresión de estos mediadores moleculares de la enfermedad, el tratamiento con la PTH[1-34] mejoró diferentes parámetros histológicos. El engrosamiento de la capa íntima es la característica histopatológica más frecuente en la sinoviopatía artrósica [141]. Esta situación se produce por proliferación y activación de los sinoviocitos situados en esta capa. Estas células sintetizan los componentes del líquido sinovial, pero también producen otras moléculas como citoquinas pro-inflamatorias. En el tejido normal la expresión de estos mediadores es muy baja, sin embargo, ante la activación de las células de la capa íntima esta producción aparece incrementada, contribuyendo a la destrucción de los tejidos articulares [183]. De hecho, ha sido descrito que estas células pueden incluso colaborar en la formación de osteofitos durante la OA [113]. Por tanto, la reducción del engrosamiento de la capa íntima por el tratamiento con la PTH[1-34] podría ser capaz de frenar la evolución de las alteraciones tisulares, no solo en la sinovia si no también en otros tejidos articulares como sería el caso de la aparición de los osteofitos.

La fibrosis de la membrana sinovial de individuos con OA se caracteriza por un depósito del COL1 en la MEC tanto de la capa íntima como de la subíntima. El estudio de la expresión de este marcador confirmó un aumento de la fibrosis sinovial en los animales OPOA, aminorado por el tratamiento con la PTH[1-34]. La fibrosis sinovial parece estar implicada en la rigidez articular observada en los pacientes con OA avanzada [141]. Por tanto, una mejoría de este factor por el tratamiento con la PTH[1-34] podría tener un efecto relevante en cuanto a sintomatología y función articular en estos enfermos. Esta reducción en el grado de fibrosis tisular tras el tratamiento con la PTH[1-34] ha sido observada también en las aortas de ratones diabéticos [39].

**En conclusión, este trabajo demuestra que la PTH[1-34] reduce la sinoviopatía asociada a la OA en un modelo animal de OPOA actuando sobre diversos aspectos como son la expresión de mediadores inflamatorios y catabólicos, la activación de las células de la capa íntima y la fibrosis sinovial, todos ellos involucrados en la evolución de la enfermedad y la sintomatología.** Por tanto, la administración intermitente de la PTH[1-34] podría ser una interesante aproximación para el tratamiento de la OA, ya que actúa sobre tres tejidos implicados en la enfermedad de forma que 1) mejora la estructura del hueso subcondral [14]; 2) reduce el daño en el cartílago articular [14, 38, 160]; y 3)

como se ha demostrado en este trabajo, aminora la sinoviopatía asociada a la OA.

#### 4. Estudio del efecto de derivados del jengibre sobre procesos tanto catabólicos como inflamatorios en los condrocitos

Numerosas plantas medicinales son utilizadas en la farmacopea tradicional china para tratar diversas dolencias, y en muchos casos estudios científicos han demostrado su efecto. El jengibre (*Zingiber officinale*) pertenece a este grupo de productos naturales, y su uso para tratar diferentes afecciones ha sido avalado en varios trabajos, incluyendo estudios en enfermedades reumáticas como la OA [191, 200]. Entre los múltiples principios activos que posee el jengibre, los shogaoles y los gingeroles son los principales, de entre los cuales el 6-S es el componente con las propiedades anti-inflamatorias más notables [61]. Sin embargo, no se conoce el efecto de este compuesto sobre la activación de los condrocitos por mediadores pro-inflamatorios específicos. Además, su similitud estructural con inhibidores de la catepsina K [99] le convierten en un potencial agente anti-catabólico. De este modo, el objetivo propuesto en este trabajo fue analizar el potencial efecto anti-inflamatorio y anti-catabólico del 6-S, y de su derivado semisintético SSi6, sobre los condrocitos.

En primer lugar, los resultados indicaron que el 6-S posee un efecto anti-inflamatorio en los condrocitos estimulados con el LPS, un agonista del TLR4, inhibiendo la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como la MCP-1 y la IL-6. Estas citoquinas han sido relacionadas directamente con la actividad de la OA, habiéndose propuesto la IL-6 como un predictor de la OA de rodilla evaluada radiográficamente [122, 192]. Además, el 6-S redujo la producción del óxido nítrico, el cual es considerado un importante mediador inflamatorio articular así como un inductor de la apoptosis y la degradación de la MEC de los condrocitos [163, 218]. Sin embargo, la estimulación con la IL-1 $\beta$  no se vio afectada por la incubación con el 6-S.

A pesar de ser un mediador relevante en la evolución de la OA, la inhibición de la señalización por la IL-1 $\beta$  no ha tenido éxito como tratamiento para esta enfermedad [40]. Por ello, resulta necesaria la búsqueda de otras dianas terapéuticas, como son las respuestas inmunes innatas mediadas por el TLR4 en los condrocitos. De hecho, la propia señalización por la IL-1 $\beta$  promueve la generación de agonistas endógenos del TLR4 [1]. Por tanto, el efecto inhibitorio del 6-S sobre la señalización del TLR4 convierte a este

compuesto en un potencial tratamiento para la OA, independientemente de la ausencia de actividad frente a la señalización de la IL-1 $\beta$ .

Es importante destacar que la activación del TLR4 y la del receptor de la IL-1 $\beta$  comparten la mayoría de las moléculas intermediarias durante su señalización intracelular. Sin embargo, el efecto del 6-S en este sistema fue dispar. Este compuesto redujo la expresión de MyD88 y de NOS2 tras la estimulación del TLR4. A pesar de que ambas proteínas son expresadas como resultado de la activación tanto del TLR4 como del receptor de la IL-1 $\beta$ , el 6-S no tuvo efecto sobre su expresión cuando el estímulo fue la IL-1 $\beta$ . El bloqueo del TLR4 fue confirmado mediante el estudio de la fosforilación de ERK1/2, un evento temprano en la activación de este receptor. Estos datos indican que la inhibición por el 6-S es una propiedad muy específica del compuesto y que su diana debe ser un elemento en la cascada de señalización superior a ERK1/2 y no compartido con la señalización de la IL-1 $\beta$ . La inhibición del TLR4 por el 6-S ha sido descrita en otros tipos celulares, y varios elementos han sido propuestos como diana de este compuesto [145, 146]. Sin embargo, nuestros resultados sugieren un bloqueo a nivel del receptor, lo cuál sería un elemento completamente ajeno a la señalización de la IL-1 $\beta$ . De acuerdo con esta idea, se ha descrito que el 6-S es capaz de impedir la dimerización del TLR4, un evento imprescindible para su señalización [3].

Además de su efecto anti-inflamatorio, el 6-S bloqueó la inducción de la actividad de la MMP-2 y la MMP-9 por la activación del TLR4. Las MMPs son importantes mediadores catabólicos durante el desarrollo de la OA, llevando a cabo la destrucción de los tejidos articulares [29]. Por tanto, su inhibición dota a este compuesto de un efecto beneficioso en el mantenimiento de la matriz tisular, reduciendo su degradación.

Otra importante enzima catabólica implicada tanto en el remodelado óseo como en el deterioro de la matriz del cartílago durante la OA es la cathepsina K [59, 102]. El 6-S mostró actividad anti-cathepsina K en ensayos acelulares por un mecanismo alostérico. Esta propiedad fue confirmada en los condrocitos humanos cultivados, en los que la capacidad inhibitoria del 6-S fue incluso mayor. El hecho de que haya sido descrito que moléculas derivadas de los condrocitos como son los GAG son también reguladores alostéricos de esta enzima, aumentando su estabilidad y por tanto su actividad, podría ser el responsable de estas diferencias encontradas en la capacidad inhibitoria en ambos sistemas [139].

Con la finalidad de determinar la relación entre las actividades anti-inflamatoria y anti-catepsina K, se utilizó un derivado semisintético del 6-S denominado SSi6 en el que se modificó el motivo estructural en el que está descrito que reside principalmente la actividad biológica del 6-S [214]. Al estudiar este derivado, observamos una pérdida de la actividad anti-inflamatoria; sin embargo, se mantuvo la actividad anti-catepsina K. Del mismo modo, el potente inhibidor de catepsinas E-64 fue capaz de bloquear la actividad de la catepsina K sin afectar a la producción de los mediadores pro-inflamatorios, indicando que estas dos propiedades del 6-S son independientes. Sin embargo, la catepsina K ha sido relacionada con la señalización de otros TLRs [8], por lo tanto, la actividad inhibitoria de estos compuestos podría proporcionar otras propiedades adicionales a las estudiadas en este trabajo.

**En resumen, este estudio propone que el 6-S es un potencial tratamiento para la OA ya que posee una actividad inhibitoria de la señalización por el TLR4, el cual juega un papel importante en la evolución de la enfermedad. Su actividad anti-catepsina K y anti-MMPs lo convierte además en un fármaco mucho más atractivo ya que le otorga efectos anti-catabólicos, no sólo sobre el cartílago si no potencialmente también sobre el hueso, ya que estas enzimas participan en el remodelado óseo.** De esta forma, un principio activo de origen natural como es el 6-S se convierte en un posible tratamiento dual, anti-inflamatorio y anti-catabólico, con potencial efecto sobre dos tejidos implicados en el desarrollo de la OA como son el cartílago y el hueso subcondral. Además, el jengibre posee la ventaja de ser un compuesto natural que es consumido habitualmente en diversas formas. Estudios de farmacocinética han mostrado que se pueden alcanzar concentraciones relevantes y no tóxicas de sus componentes en el suero de sujetos sanos tras la administración oral de jengibre [230]. Por tanto, la utilización del jengibre como suplemento nutricional podría ser una herramienta terapéutica en la OA, no sólo para reducir los síntomas sino también para frenar la evolución de la enfermedad gracias a sus propiedades anti-catabólicas.



## **VI. CONCLUSIONES**

1. El cartílago articular de mujeres menopáusicas no expresa cantidades significativas de la enzima aromatasa, siendo por tanto incapaz de producir estrógenos de forma local. Este resultado sugiere que la modulación farmacológica de la enzima aromatasa no afecta de manera directa al metabolismo del cartílago.
2. El cultivo de los condrocitos en monocapa conlleva alteraciones en el metabolismo estrogénico, mediante la inducción de la expresión de la enzima aromatasa, que podrían ser irreversibles. Estrategias terapéuticas como el trasplante de condrocitos que impliquen una expansión celular en cultivo en monocapa deberán tener en consideración estas aberraciones metabólicas.
3. La LCN2 es una adipoquina relacionada con la diferenciación osteoblástica, cuya expresión se ve drásticamente reducida durante las etapas iniciales de este proceso, y es regulada por factores anabólicos (TGF $\beta$  e IGF-1) y catabólicos (IL-1 $\beta$ , LPS y glucocorticoides).
4. La LCN2 podría ser un mediador relevante en la relación osteocondral durante el desarrollo de la OA, siendo deletérea para los OB y favoreciendo procesos catabólicos en el cartílago mediante su inducción en este tejido por el hueso subcondral alterado. A pesar de que los factores anabólicos TGF $\beta$  e IGF-1 muestran un efecto beneficioso sobre la expresión de la LCN2 en el cartílago, la alteración de la señalización de estos factores de crecimiento podría perpetuar los fenómenos catabólicos en el cartílago articular mediados por la LCN2 durante la OA.
5. La administración intermitente de la PTH[1-34] podría ser un tratamiento prometedor para pacientes que presenten sinovitis crónica asociada a la OA, mejorando la sintomatología y reduciendo la evolución de la enfermedad al actuar sobre el componente inflamatorio, catabólico y fibrótico de la membrana sinovial además de la estructura ósea y del cartílago.
6. El 6-S presenta propiedades anti-inflamatorias, por bloqueo de la señalización del TLR4, así como anti-catabólicas, por reducción de las actividades MMP y cathepsina K, en los condrocitos. Esto le convierte en un potencial agente para detener la degradación del cartílago pero también el elevado remodelado óseo en el hueso subcondral que ocurre durante la OA.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

1. Abdollahi-Roodsaz S, Joosten L a B, Koenders MI, van den Brand BT, van de Loo F a J, van den Berg WB (2009). Local interleukin-1-driven joint pathology is dependent on toll-like receptor 4 activation. *Am J Pathol* 175(5):2004–13.
2. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios FORSTEO. <http://www.aemps.gob.es/cima/especialidad.do?metodo=verPresentaciones&codigo=03247001>.
3. Ahn S-I, Lee J-K, Youn H-S (2009). Inhibition of homodimerization of toll-like receptor 4 by 6-shogaol. *Mol Cells* 27(2):211–5.
4. Al-Arfaj AS (2003). Radiographic osteoarthritis and serum cholesterol. *Saudi Med J* 24(7):745–7.
5. Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J (2005). The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet* 366(9491):1059–62.
6. Allori AC, Sillon AM, Warren SM (2008). Biological basis of bone formation, remodeling, and repair-part I: biochemical signaling molecules. *Tissue Eng Part B Rev* 14(3):259–73.
7. Ameye LG, Chee WSS (2006). Osteoarthritis and nutrition. From nutraceuticals to functional foods: a systematic review of the scientific evidence. *Arthritis Res Ther* 8(4):R127.
8. Asagiri M, Hirai T, Kunigami T, Kamano S, Gober H-J, Okamoto K, Nishikawa K, Latz E, Golenbock DT, Aoki K, Ohya K, Imai Y, Morishita Y, Miyazono K, Kato S, Saftig P, Takayanagi H (2008). Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis. *Science (80- )* 319(5863):624–7.
9. Atsumi T, Miwa Y, Kimata K, Ikawa Y (1990). A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells. *Cell Differ Dev* 30(2):109–16.
10. Ayral X, Pickering EH, Woodworth TG, Mackillop N, Dougados M (2005). Synovitis: a potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis -- results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients. *Osteoarthritis Cartilage* 13(5):361–7.

11. Baffi MO, Slattery E, Sohn P, Moses HL, Chytil A, Serra R (2004). Conditional deletion of the TGF-beta type II receptor in Col2a expressing cells results in defects in the axial skeleton without alterations in chondrocyte differentiation or embryonic development of long bones. *Dev Biol* 276(1):124–42.
12. Le Bail J, Liagre B, Vergne P, Bertin P, Beneytout J, Habrioux G (2001). Aromatase in synovial cells from postmenopausal women. *Steroids* 66(10):749–57.
13. Bellido M, Lugo L, Roman-Blas J a, Castañeda S, Caeiro JR, Dapia S, Calvo E, Largo R, Herrero-Beaumont G (2010). Subchondral bone microstructural damage by increased remodelling aggravates experimental osteoarthritis preceded by osteoporosis. *Arthritis Res Ther* 12(4):R152.
14. Bellido M, Lugo L, Roman-Blas J a, Castañeda S, Calvo E, Largo R, Herrero-Beaumont G (2011). Improving subchondral bone integrity reduces progression of cartilage damage in experimental osteoarthritis preceded by osteoporosis. *Osteoarthritis Cartilage* 19(10):1228–36.
15. Bellino F (1992). Estrogen metabolism, not biosynthesis, in rabbit articular cartilage and isolated chondrocytes: a preliminary study. *Steroids* 57(10):507–510.
16. Berendsen AD, Olsen BR (2014). Osteoblast-adipocyte lineage plasticity in tissue development, maintenance and pathology. *Cell Mol Life Sci* 71(3):493–7.
17. Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS (1986). Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(8):2496–500.
18. Bettica P, Cline G, Hart DJ, Meyer J, Spector TD (2002). Evidence for increased bone resorption in patients with progressive knee osteoarthritis: longitudinal results from the Chingford study. *Arthritis Rheum* 46(12):3178–84.
19. Bian Q, Liang Q-Q, Hou W, Wan C, Li C-G, Zhao Y-J, Lu S, Shi Q, Wang Y-J (2011). Prolonged and repeated upright posture promotes bone formation in rat lumbar vertebrae. *Spine (Phila Pa 1976)* 36(6):E380–7.
20. Bijlsma JWJ, Berenbaum F, Lafeber FPJG (2011). Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet* 377(9783):2115–26.

21. Blaney Davidson EN, Scharstuhl A, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB (2005). Reduced transforming growth factor-beta signaling in cartilage of old mice: role in impaired repair capacity. *Arthritis Res Ther* 7(6):R1338–47.
22. Blaney Davidson EN, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB (2006). Expression of transforming growth factor-beta (TGFbeta) and the TGFbeta signalling molecule SMAD-2P in spontaneous and instability-induced osteoarthritis: role in cartilage degradation, chondrogenesis and osteophyte formation. *Ann Rheum Dis* 65(11):1414–21.
23. Bolbos RI, Zuo J, Banerjee S, Link TM, Ma CB, Li X, Majumdar S (2008). Relationship between trabecular bone structure and articular cartilage morphology and relaxation times in early OA of the knee joint using parallel MRI at 3 T. *Osteoarthritis Cartilage* 16(10):1150–9.
24. Bonewald LF, Johnson ML (2008). Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* 42(4):606–15.
25. Borkham-Kamphorst E, van de Leur E, Zimmermann HW, Karlmark KR, Tihaa L, Haas U, Tacke F, Berger T, Mak TW, Weiskirchen R (2013). Protective effects of lipocalin-2 (LCN2) in acute liver injury suggest a novel function in liver homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1832(5):660–73.
26. Bougault C, Aubert-Foucher E, Paumier A, Perrier-Groult E, Huot L, Hot D, Duterque-Coquillaud M, Mallein-Gerin F (2012). Dynamic compression of chondrocyte-agarose constructs reveals new candidate mechanosensitive genes. *PLoS One* 7(5):e36964.
27. Brömme D, Okamoto K, Wang BB, Biroc S (1996). Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 271(4):2126–32.
28. Burr DB, Gallant M a (2012). Bone remodelling in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 8(11):665–73.
29. Burrage PS, Brinckerhoff CE (2007). Molecular targets in osteoarthritis:

- metalloproteinases and their inhibitors. *Curr Drug Targets* 8(2):293–303.
30. Calvo E, Castañeda S, Largo R, Fernández-Valle ME, Rodríguez-Salvanés F, Herrero-Beaumont G (2007). Osteoporosis increases the severity of cartilage damage in an experimental model of osteoarthritis in rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* 15(1):69–77.
31. Capulli M, Rufo A, Teti A, Rucci N (2009). Global transcriptome analysis in mouse calvarial osteoblasts highlights sets of genes regulated by modeled microgravity and identifies a “mechanoresponsive osteoblast gene signature”. *J Cell Biochem* 107(2):240–52.
32. Carmeliet G, Nys G, Bouillon R (1997). Microgravity reduces the differentiation of human osteoblastic MG-63 cells. *J Bone Miner Res* 12(5):786–94.
33. Castañeda S, Largo R, Calvo E, Bellido M, Gómez-Vaquero C, Herrero-Beaumont G (2010). Effects of estrogen deficiency and low bone mineral density on healthy knee cartilage in rabbits. *J Orthop Res* 28(6):812–8.
34. Castañeda S, Roman-Blas J a, Largo R, Herrero-Beaumont G (2012). Subchondral bone as a key target for osteoarthritis treatment. *Biochem Pharmacol* 83(3):315–23.
35. Castillo AB, Triplett JW, Pavalko FM, Turner CH (2014). Estrogen receptor- $\beta$  regulates mechanical signaling in primary osteoblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 306(8):E937–44.
36. Chagin a S, Chrysis D, Takigawa M, Ritzen EM, Sävendahl L (2006). Locally produced estrogen promotes fetal rat metatarsal bone growth; an effect mediated through increased chondrocyte proliferation and decreased apoptosis. *J Endocrinol* 188(2):193–203.
37. Chakraborty S, Kaur S, Guha S, Batra SK (2012). The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1826(1):129–69.
38. Chang J-K, Chang L-H, Hung S-H, Wu S-C, Lee H-Y, Lin Y-S, Chen C-H, Fu Y-C, Wang G-J, Ho M-L (2009). Parathyroid hormone 1-34 inhibits terminal differentiation of human articular chondrocytes and osteoarthritis progression in

- rats. *Arthritis Rheum* 60(10):3049–60.
39. Cheng S-L, Shao J-S, Halstead LR, Distelhorst K, Sierra O, Towler DA (2010). Activation of vascular smooth muscle parathyroid hormone receptor inhibits Wnt/beta-catenin signaling and aortic fibrosis in diabetic arteriosclerosis. *Circ Res* 107(2):271–82.
40. Chevalier X, Goupille P, Beaulieu AD, Burch FX, Bensen WG, Conrozier T, Loeuille D, Kivitz AJ, Silver D, Appleton BE (2009). Intraarticular injection of anakinra in osteoarthritis of the knee: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum* 61(3):344–52.
41. Chiba K, Uetani M, Kido Y, Ito M, Okazaki N, Taguchi K, Shindo H (2011). Osteoporotic changes of subchondral trabecular bone in osteoarthritis of the knee: a 3-T MRI study. *Osteoporos Int* 23(2):589–597.
42. Chou H-Y, Elangovan N, Lee Y-C, Lin HH, Chu S-T (2006). Internalization and trafficking of mouse 24p3 protein in L929 cells. *J Endocrinol* 191(1):239–47.
43. Chow JW, Jagger CJ, Chambers TJ (1993). Characterization of osteogenic response to mechanical stimulation in cancellous bone of rat caudal vertebrae. *Am J Physiol* 265(2 Pt 1):E340–7.
44. Chung C, Burdick JA (2008). Engineering cartilage tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 60(2):243–62.
45. Cillero-Pastor B, Eijkel G, Kiss A, Blanco FJ, Heeren RM a (2012). Time-of-flight secondary ion mass spectrometry-based molecular distribution distinguishing healthy and osteoarthritic human cartilage. *Anal Chem* 84(21):8909–16.
46. Claassen H, Schünke M, Kurz B (2005). Estradiol protects cultured articular chondrocytes from oxygen-radical-induced damage. *Cell Tissue Res* 319(3):439–45.
47. Claassen H, Steffen R, Hassenpflug J, Varoga D, Wruck CJ, Brandenburg LO, Pufe T (2010). 17 $\beta$ -estradiol reduces expression of MMP-1, -3, and -13 in human primary articular chondrocytes from female patients cultured in a three dimensional alginate system. *Cell Tissue Res* 342(2):283–93.
48. Clockaerts S, Bastiaansen-Jenniskens YM, Runhaar J, Van Osch GJVM, Van Offel JF,



- Verhaar JAN, De Clerck LS, Somville J (2010). The infrapatellar fat pad should be considered as an active osteoarthritic joint tissue: a narrative review. *Osteoarthritis Cartilage* 18(7):876–82.
49. Cohen NP, Foster RJ, Mow VC (1998). Composition and dynamics of articular cartilage: structure, function, and maintaining healthy state. *J Orthop Sports Phys Ther* 28(4):203–15.
50. Collet P, Uebelhart D, Vico L, Moro L, Hartmann D, Roth M, Alexandre C (1997). Effects of 1- and 6-month spaceflight on bone mass and biochemistry in two humans. *Bone* 20(6):547–51.
51. Conde J, Gomez R, Bianco G, Scotece M, Lear P, Dieguez C, Gomez-Reino J, Lago F, Gualillo O (2011). Expanding the adipokine network in cartilage: identification and regulation of novel factors in human and murine chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 70(3):551–9.
52. Conde J, Scotece M, Gómez R, López V, Gómez-Reino JJ, Lago F, Gualillo O (2011). Adipokines: biofactors from white adipose tissue. A complex hub among inflammation, metabolism, and immunity. *Biofactors* 37(6):413–20.
53. Conde J, Scotece M, López V, Abella V, Hermida M, Pino J, Lago F, Gómez-Reino JJ, Gualillo O (2014). Differential expression of adipokines in infrapatellar fat pad (IPFP) and synovium of osteoarthritis patients and healthy individuals. *Ann Rheum Dis* 73(3):631–3.
54. Cornil C a (2009). Rapid regulation of brain oestrogen synthesis: the behavioural roles of oestrogens and their fates. *J Neuroendocrinol* 21(3):217–26.
55. Costa D, Lazzarini E, Canciani B, Giuliani A, Spanò R, Marozzi K, Manescu A, Cancedda R, Tavella S (2013). Altered bone development and turnover in transgenic mice over-expressing lipocalin-2 in bone. *J Cell Physiol* 228(11):2210–21.
56. Crockett JC, Rogers MJ, Coxon FP, Hocking LJ, Helfrich MH (2011). Bone remodelling at a glance. *J Cell Sci* 124(7):991–998.
57. Dallas SL, Rosser JL, Mundy GR, Bonewald LF (2002). Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF-beta )-binding protein-1 by osteoclasts. A

- cellular mechanism for release of TGF-beta from bone matrix. *J Biol Chem* 277(24):21352–60.
58. Darling EM, Athanasiou K a (2005). Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J Orthop Res* 23(2):425–32.
59. Dejica VM, Mort JS, Laverty S, Antoniou J, Zukor DJ, Tanzer M, Poole a R (2012). Increased type II collagen cleavage by cathepsin K and collagenase activities with aging and osteoarthritis in human articular cartilage. *Arthritis Res Ther* 14(3):R113.
60. Devireddy LR, Gazin C, Zhu X, Green MR (2005). A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell* 123(7):1293–305.
61. Dugasani S, Pichika MR, Nadarajah VD, Balijepalli MK, Tandra S, Korlakunta JN (2010). Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol. *J Ethnopharmacol* 127(2):515–20.
62. Van der Eerden BCJ (2002). Sex Steroid Metabolism in the Tibial Growth Plate of the Rat. *Endocrinology* 143(10):4048–4055.
63. Engström G, Gerhardsson de Verdier M, Rollof J, Nilsson PM, Lohmander LS (2009). C-reactive protein, metabolic syndrome and incidence of severe hip and knee osteoarthritis. A population-based cohort study. *Osteoarthritis Cartilage* 17(2):168–73.
64. Esbrit P, Alcaraz MJ (2013). Current perspectives on parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) as bone anabolic therapies. *Biochem Pharmacol* 85(10):1417–23.
65. Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Hirsch R, Helmick CG, Jordan JM, Kington RS, Lane NE, Nevitt MC, Zhang Y, Sowers M, McAlindon T, Spector TD, Poole AR, Yanovski SZ, Ateshian G, Sharma L, Buckwalter JA, Brandt KD, et al (2000). Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med* 133(8):635–46.
66. Findlay DM (2007). Vascular pathology and osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 46(12):1763–8.
67. Freemont a J, Hampson V, Tilman R, Goupille P, Taiwo Y, Hoyland J a (1997). Gene

- expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 by chondrocytes in osteoarthritic human knee articular cartilage is zone and grade specific. *Ann Rheum Dis* 56(9):542–9.
68. Fubini SL, Todhunter RJ, Burton-Wurster N, Vernier-Singer M, MacLeod JN (2001). Corticosteroids alter the differentiated phenotype of articular chondrocytes. *J Orthop Res* 19(4):688–95.
69. Goessler UR, Bugert P, Bieback K, Sadick H, Verse T, Baisch A, Hörmann K, Riedel F (2005). In vitro analysis of matrix proteins and growth factors in dedifferentiating human chondrocytes for tissue-engineered cartilage. *Acta Otolaryngol* 125(6):647–53.
70. Goldring MB, Birkhead J, Sandell LJ, Kimura T, Krane SM (1988). Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes. *J Clin Invest* 82(6):2026–37.
71. Goldring MB, Goldring SR (2007). Osteoarthritis. *J Cell Physiol* 213(3):626–34.
72. Goldring MB, Otero M, Plumb D a, Dragomir C, Favero M, El Hachem K, Hashimoto K, Roach HI, Olivotto E, Borzi RM, Marcu KB (2011). Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *Eur Cell Mater* 21:202–20.
73. Gomez R, Lago F, Gomez-Reino J, Dieguez C, Gualillo O (2009). Adipokines in the skeleton: influence on cartilage function and joint degenerative diseases. *J Mol Endocrinol* 43(1):11–8.
74. Gómez R, Scotece M, Conde J, Lopez V, Pino J, Lago F, Gómez-Reino JJ, Gualillo O (2013). Nitric oxide boosts TLR-4 mediated lipocalin 2 expression in chondrocytes. *J Orthop Res* 31(7):1046–52.
75. Gómez R, Villalvilla A, Largo R, Gualillo O, Herrero-Beaumont G Is Toll-like Receptor 4 a potential target for osteoarthritis treatment? *Nat. Rev. Rheumatol*.
76. Gonsalves M, Barker a L, Macpherson J V, Unwin PR, O'Hare D, Winlove CP (2000). Scanning electrochemical microscopy as a local probe of oxygen permeability in cartilage. *Biophys J* 78(3):1578–88.

- 
77. Griess P (1879). Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen”. *Berichte der Dtsch Chem Gesellschaft* 12(1):426–428.
78. Guilak F (2011). Biomechanical factors in osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 25(6):815–23.
79. Gupta K, Shukla M, Cowland JB, Malemud CJ, Haqqi TM (2007). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is expressed in osteoarthritis and forms a complex with matrix metalloproteinase 9. *Arthritis Rheum* 56(10):3326–35.
80. Halabian R, Tehrani HA, Jahanian-Najafabadi A, Habibi Roudkenar M (2013). Lipocalin-2-mediated upregulation of various antioxidants and growth factors protects bone marrow-derived mesenchymal stem cells against unfavorable microenvironments. *Cell Stress Chaperones* 18(6):785–800.
81. Hameed F, Ihm J (2012). Injectable medications for osteoarthritis. *PM R* 4(5 Suppl):S75–81.
82. Harigai M, Hara M, Yoshimura T, Leonard EJ, Inoue K, Kashiwazaki S (1993). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in inflammatory joint diseases and its involvement in the cytokine network of rheumatoid synovium. *Clin Immunol Immunopathol* 69(1):83–91.
83. Hart DJ, Doyle D V, Spector TD (1995). Association between metabolic factors and knee osteoarthritis in women: the Chingford Study. *J Rheumatol* 22(6):1118–23.
84. Henrotin Y, Pessesse L, Sanchez C (2012). Subchondral bone and osteoarthritis: biological and cellular aspects. *Osteoporos Int* 23 Suppl 8:S847–51.
85. Hernández JL, Garcés CM, Sumillera M, Fernández-Aldasoro E V, García-Ibarbia C, Ortiz-Gómez J a, Arozamena J, Alonso M a, Riancho J a (2008). Aromatase expression in osteoarthritic and osteoporotic bone. *Arthritis Rheum* 58(6):1696–700.
86. Hochberg M, Silman A, Smolen J, Weinblatt M, Weisman M (2010). *Rheumatology*, 5th ed. 2228.
87. Hodsman AB, Bauer DC, Dempster DW, Dian L, Hanley D a, Harris ST, Kendler DL, McClung MR, Miller PD, Olszynski WP, Orwoll E, Yuen CK (2005). Parathyroid

- hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use. *Endocr Rev* 26(5):688–703.
88. Hsieh YF, Robling a G, Ambrosius WT, Burr DB, Turner CH (2001). Mechanical loading of diaphyseal bone in vivo: the strain threshold for an osteogenic response varies with location. *J Bone Miner Res* 16(12):2291–7.
89. Hui W, Litherland GJ, Elias MS, Kitson GI, Cawston TE, Rowan AD, Young D a (2012). Leptin produced by joint white adipose tissue induces cartilage degradation via upregulation and activation of matrix metalloproteinases. *Ann Rheum Dis* 71(3):455–62.
90. Hvidberg V, Jacobsen C, Strong RK, Cowland JB, Moestrup SK, Borregaard N (2005). The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Lett* 579(3):773–7.
91. Imai Y, Nakamura T, Matsumoto T, Takaoka K, Kato S (2009). Molecular mechanisms underlying the effects of sex steroids on bone and mineral metabolism. *J Bone Miner Metab* 27(2):127–30.
92. James AW (2013). Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica (Cairo)* 2013:684736.
93. Javed A, Chen H, Ghori FY (2010). Genetic and transcriptional control of bone formation. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 22(3):283–93, v.
94. Jiang B, Kamat a, Mendelson CR (2000). Hypoxia prevents induction of aromatase expression in human trophoblast cells in culture: potential inhibitory role of the hypoxia-inducible transcription factor Mash-2 (mammalian achaete-scute homologous protein-2). *Mol Endocrinol* 14(10):1661–73.
95. Jilka RL (2007). Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone* 40(6):1434–46.
96. Jin G, Sah RL, Li YS, Lotz M, Shyy JY, Chien S (2000). Biomechanical regulation of matrix metalloproteinase-9 in cultured chondrocytes. *J Orthop Res* 18(6):899–908.
97. Kaneshita Y, Goda S, Kawamoto T (2007). The effect of matrix metalloproteinase-9 on

- the differentiation into osteoclast cells on RAW264 cells. *Orthod Waves* 66(4):122–128.
98. Katano M, Okamoto K, Arito M, Kawakami Y, Kurokawa MS, Suematsu N, Shimada S, Nakamura H, Xiang Y, Masuko K, Nishioka K, Yudoh K, Kato T (2009). Implication of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induced neutrophil gelatinase-associated lipocalin in pathogenesis of rheumatoid arthritis revealed by proteome analysis. *Arthritis Res Ther* 11(1):R3.
99. Katunuma N (2011). Structure-based development of specific inhibitors for individual cathepsins and their medical applications. *Proc Japan Acad Ser B* 87(2):29–39.
100. Kehrer JP (2010). Lipocalin-2: pro- or anti-apoptotic? *Cell Biol Toxicol* 26(2):83–9.
101. Kjeldsen L, Cowland JB, Borregaard N (2000). Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim Biophys Acta* 1482(1-2):272–83.
102. Kozawa E, Nishida Y, Cheng XW, Urakawa H, Arai E, Futamura N, Shi G-P, Kuzuya M, Hu L, Sasaki T, Ishiguro N (2012). Osteoarthritic change is delayed in a Ctsk-knockout mouse model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 64(2):454–64.
103. Van der Kraan PM (2014). Age-related alterations in TGF beta signaling as a causal factor of cartilage degeneration in osteoarthritis. *Biomed Mater Eng* 24:75–80.
104. Van der Kraan PM, van den Berg WB (2007). Osteophytes: relevance and biology. *Osteoarthritis Cartilage* 15(3):237–44.
105. Van der Kraan PM, van den Berg WB (2012). Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthritis Cartilage* 20(3):223–32.
106. Van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, Blom a, van den Berg WB (2009). TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads. *Osteoarthritis Cartilage* 17(12):1539–45.
107. Krenn V, Morawietz L, Häupl T, Neidel J, Petersen I, König A (2002). Grading of chronic synovitis--a histopathological grading system for molecular and diagnostic

- pathology. *Pathol Res Pract* 198(5):317–25.
108. Krzeski P, Buckland-Wright C, Bálint G, Cline GA, Stoner K, Lyon R, Beary J, Aronstein WS, Spector TD (2007). Development of musculoskeletal toxicity without clear benefit after administration of PG-116800, a matrix metalloproteinase inhibitor, to patients with knee osteoarthritis: a randomized, 12-month, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Res Ther* 9(5):R109.
  109. Lago F, Gómez R, Conde J, Scotece M, Gómez-Reino JJ, Gualillo O (2011). Cardiometabolic comorbidities and rheumatic diseases: focus on the role of fat mass and adipokines. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 63(8):1083–90.
  110. Lau K-HW, Baylink DJ, Zhou X-D, Rodriguez D, Bonewald LF, Li Z, Ruffoni D, Müller R, Kesavan C, Sheng MH-C (2013). Osteocyte-derived insulin-like growth factor I is essential for determining bone mechanosensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305(2):E271–81.
  111. Leclerc N, Luppen C a, Ho V V, Nagpal S, Hacia JG, Smith E, Frenkel B (2004). Gene expression profiling of glucocorticoid-inhibited osteoblasts. *J Mol Endocrinol* 33(1):175–93.
  112. Lemare F, Steimberg N, Le Griel C, Demignot S, Adolphe M (1998). Dedifferentiated chondrocytes cultured in alginate beads: restoration of the differentiated phenotype and of the metabolic responses to interleukin-1beta. *J Cell Physiol* 176(2):303–13.
  113. Van Lent PLEM, Blom AB, van der Kraan P, Holthuysen AEM, Vitters E, van Rooijen N, Smeets RL, Nabbe KCAM, van den Berg WB (2004). Crucial role of synovial lining macrophages in the promotion of transforming growth factor beta-mediated osteophyte formation. *Arthritis Rheum* 50(1):103–11.
  114. Leung L, Radulovich N, Zhu C-Q, Organ S, Bandarchi B, Pintilie M, To C, Panchal D, Tsao MS (2012). Lipocalin2 promotes invasion, tumorigenicity and gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One* 7(10):e46677.
  115. Levick JR, McDonald JN (1995). Fluid movement across synovium in healthy joints: role of synovial fluid macromolecules. *Ann Rheum Dis* 54(5):417–23.
  116. Li Y, Wei X, Zhou J, Wei L (2013). The age-related changes in cartilage and

- osteoarthritis. *Biomed Res Int* 2013:916530.
117. Li F, Yu S, Feng X, Wang H, Fu S, Ding Y (2009). Locally synthesized estrogen: a novel target in the development of OA. *Med Hypotheses* 73(2):144–6.
118. Lian JB, Stein GS (1992). Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 3(3):269–305.
119. Lin Y-M, Hsu C-J, Liao Y-Y, Chou M-C, Tang C-H (2012). The CCL2/CCR2 axis enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in human synovial fibroblasts. *PLoS One* 7(11):e49999.
120. Lipari L, Gerbino A (2013). Expression of gelatinases (MMP-2, MMP-9) in human articular cartilage. *Int J Immunopathol Pharmacol* 26(3):817–23.
121. Little CB, Barai A, Burkhardt D, Smith SM, Fosang AJ, Werb Z, Shah M, Thompson EW (2009). Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis Rheum* 60(12):3723–33.
122. Livshits G, Zhai G, Hart DJ, Kato BS, Wang H, Williams FMK, Spector TD (2009). Interleukin-6 is a significant predictor of radiographic knee osteoarthritis: The Chingford Study. *Arthritis Rheum* 60(7):2037–45.
123. Loeser RF, Gandhi U, Long DL, Yin W, Chubinskaya S (2014). Aging and oxidative stress reduce the response of human articular chondrocytes to insulin-like growth factor-1 and osteogenic protein-1. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ)* 1–31.
124. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB (2012). Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum* 64(6):1697–707.
125. Lories RJ, Luyten FP (2011). The bone-cartilage unit in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 7(1):43–9.
126. Lugo L, Villalvilla A, Largo R, Herrero-Beaumont G, Roman-Blas JA (2014). Selective estrogen receptor modulators (SERMs): new alternatives for osteoarthritis? *Maturitas* 77(4):380–4.



- 
127. Luppen C a, Smith E, Spevak L, Boskey AL, Frenkel B (2003). Bone morphogenetic protein-2 restores mineralization in glucocorticoid-inhibited MC3T3-E1 osteoblast cultures. *J bone Miner Res* 18(7):1186–97.
  128. Magnano MD, Chakravarty EF, Broudy C, Chung L, Kelman A, Hillygus J, Genovese MC (2007). A pilot study of tumor necrosis factor inhibition in erosive/inflammatory osteoarthritis of the hands. *J Rheumatol* 34(6):1323–7.
  129. Makowski GS, Ramsby ML (2003). Zymographic analysis of latent and activated forms of matrix metalloproteinase-2 and -9 in synovial fluid: correlation to polymorphonuclear leukocyte infiltration and in response to infection. *Clin Chim Acta* 329(1-2):77–81.
  130. Marie PJ, Kassem M (2011). Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging, and future anabolic targets. *Eur J Endocrinol* 165(1):1–10.
  131. Matsunobu T, Torigoe K, Ishikawa M, de Vega S, Kulkarni AB, Iwamoto Y, Yamada Y (2009). Critical roles of the TGF-beta type I receptor ALK5 in perichondrial formation and function, cartilage integrity, and osteoblast differentiation during growth plate development. *Dev Biol* 332(2):325–38.
  132. Messer JG, Kilbarger AK, Erikson KM, Kipp DE (2009). Iron overload alters iron-regulatory genes and proteins, down-regulates osteoblastic phenotype, and is associated with apoptosis in fetal rat calvaria cultures. *Bone* 45(5):972–9.
  133. Mori S, Harruff R, Burr DB (1993). Microcracks in articular calcified cartilage of human femoral heads. *Arch Pathol Lab Med* 117(2):196–8.
  134. Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2):55–63.
  135. Murakami S (2000). Potent Inhibition of the Master Chondrogenic Factor Sox9 Gene by Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor-alpha. *J Biol Chem* 275(5):3687–3692.
  136. Mushtaq T, Farquharson C, Seawright E, Ahmed SF (2002). Glucocorticoid effects on chondrogenesis, differentiation and apoptosis in the murine ATDC5 chondrocyte cell line. *J Endocrinol* 175(3):705–13.

- 
137. Neu CP, Khalafi A, Komvopoulos K, Schmid TM, Reddi a H (2007). Mechanotransduction of bovine articular cartilage superficial zone protein by transforming growth factor beta signaling. *Arthritis Rheum* 56(11):3706–14.
138. Neuhold LA, Killar L, Zhao W, Sung ML, Warner L, Kulik J, Turner J, Wu W, Billingham C, Meijers T, Poole AR, Babij P, DeGennaro LJ (2001). Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *J Clin Invest* 107(1):35–44.
139. Novinec M, Kovacic L, Lenarcic B, Baici A (2010). Conformational flexibility and allosteric regulation of cathepsin K. *Biochem J* 429(2):379–89.
140. Nuttall ME, Shah F, Singh V, Thomas-Porch C, Frazier T, Gimble JM (2014). Adipocytes and the regulation of bone remodeling: a balancing act. *Calcif Tissue Int* 94(1):78–87.
141. Oehler S, Neureiter D, Meyer-Scholten C, Aigner T (2002). Subtyping of osteoarthritic synoviopathy. *Clin Exp Rheumatol* 20(5):633–40.
142. Oreffo RO, Mundy GR, Seyedin SM, Bonewald LF (1989). Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 158(3):817–23.
143. Owen HC, Roberts SJ, Ahmed SF, Farquharson C (2008). Dexamethasone-induced expression of the glucocorticoid response gene lipocalin 2 in chondrocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294(6):E1023–34.
144. Öz OK, Millsaps R, Welch R, Birch J, Zerwekh JE (2001). Expression of aromatase in the human growth plate. *J Mol Endocrinol* 27(2):249–53.
145. Pan M-H, Hsieh M-C, Hsu P-C, Ho S-Y, Lai C-S, Wu H, Sang S, Ho C-T (2008). 6-Shogaol suppressed lipopolysaccharide-induced up-expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages. *Mol Nutr Food Res* 52(12):1467–77.
146. Park S-J, Lee M-Y, Son B-S, Youn H-S (2009). TBK1-Targeted Suppression of TRIF-Dependent Signaling Pathway of Toll-Like Receptors by 6-Shogaol, an Active Component of Ginger. *Biosci Biotechnol Biochem* 73(7):1474–1478.
147. Peake NJ, Foster HE, Khawaja K, Cawston TE, Rowan a D (2006). Assessment of the

- clinical significance of gelatinase activity in patients with juvenile idiopathic arthritis using quantitative protein substrate zymography. *Ann Rheum Dis* 65(4):501–7.
148. Pottie P, Presle N, Terlain B, Netter P, Mainard D, Berenbaum F (2006). Obesity and osteoarthritis: more complex than predicted! *Ann Rheum Dis* 65(11):1403–5.
149. Prieto-Alhambra D, Judge A, Javaid MK, Cooper C, Diez-Perez A, Arden NK (2014). Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints. *Ann Rheum Dis* 73(9):1659–64.
150. Puenpatom RA, Victor TW (2009). Increased prevalence of metabolic syndrome in individuals with osteoarthritis: an analysis of NHANES III data. *Postgrad Med* 121(6):9–20.
151. Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ (1992). Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res* 7(6):683–92.
152. Rai MF, Sandell L (2011). Inflammatory Mediators: Tracing Links Between Obesity and Osteoarthritis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 21(2):131–142.
153. Reijnders CMA, Bravenboer N, Tromp AM, Blankenstein MA, Lips P (2007). Effect of mechanical loading on insulin-like growth factor-I gene expression in rat tibia. *J Endocrinol* 192(1):131–40.
154. Reynard LN, Loughlin J (2013). Insights from human genetic studies into the pathways involved in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 9(10):573–83.
155. Richette P, Dumontier M-F, Tahiri K, Widerak M, Torre A, Benallaoua M, Benallaloua M, Rannou F, Corvol M-T, Savouret J-F (2007). Oestrogens inhibit interleukin 1beta-mediated nitric oxide synthase expression in articular chondrocytes through nuclear factor-kappa B impairment. *Ann Rheum Dis* 66(3):345–50.
156. Roman-Blas J a, Castañeda S, Largo R, Herrero-Beaumont G (2009). Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. *Arthritis Res Ther* 11(5):241.

- 
157. Ross MH, Pawlina W (2011). Histology: A Text and Atlas, with Correlated Cell and Molecular Biology, 6th ed. 974.
158. Rubin CT, Lanyon LE (1985). Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude. *Calcif Tissue Int* 37(4):411–7.
159. Sadie-Van Gijzen H, Crowther NJ, Hough FS, Ferris WF (2013). The interrelationship between bone and fat: from cellular see-saw to endocrine reciprocity. *Cell Mol Life Sci* 70(13):2331–49.
160. Sampson ER, Hilton MJ, Tian Y, Chen D, Schwarz EM, Mooney RA, Bukata S V, O’Keefe RJ, Awad H, Puzas JE, Rosier RN, Zuscik MJ (2011). Teriparatide as a chondroregenerative therapy for injury-induced osteoarthritis. *Sci Transl Med* 3(101):101ra93.
161. Sanchez C, Deberg M a, Piccardi N, Msika P, Reginster J-YL, Henrotin YE (2005). Subchondral bone osteoblasts induce phenotypic changes in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 13(11):988–97.
162. Sanchez C, Pesesse L, Gabay O, Delcour J-P, Msika P, Baudouin C, Henrotin YE (2012). Regulation of subchondral bone osteoblast metabolism by cyclic compression. *Arthritis Rheum* 64(4):1193–203.
163. Sasaki K, Hattori T, Fujisawa T, Takahashi K, Inoue H, Takigawa M (1998). Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes. *J Biochem* 123(3):431–9.
164. Sasano H, Uzuki M, Sawai T, Nagura H, Matsunaga G, Kashimoto O, Harada N (1997). Aromatase in human bone tissue. *J bone Miner Res* 12(9):1416–23.
165. Säwendahl L (2005). Hormonal regulation of growth plate cartilage. *Horm Res* 64 Suppl 2(suppl 2):94–7.
166. Scanzello CR, Goldring SR (2012). The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone* 51(2):249–57.
167. Scanzello CR, McKeon B, Swaim BH, DiCarlo E, Asomugha EU, Kanda V, Nair A, Lee DM, Richmond JC, Katz JN, Crow MK, Goldring SR (2011). Synovial

- inflammation in patients undergoing arthroscopic meniscectomy: molecular characterization and relationship to symptoms. *Arthritis Rheum* 63(2):391–400.
168. Schicht M, Ernst J, Nielitz A, Fester L, Tsokos M, Guddat SS, Bräuer L, Bechmann J, Delank K-S, Wohlrab D, Paulsen F, Claassen H (2014). Articular cartilage chondrocytes express aromatase and use enzymes involved in estrogen metabolism. *Arthritis Res Ther* 16(2):R93.
169. Schmidt M, Weidler C, Naumann H, Anders S, Schölmerich J, Straub RH (2005). Androgen conversion in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synoviocytes--androstenedione and testosterone inhibit estrogen formation and favor production of more potent 5alpha-reduced androgens. *Arthritis Res Ther* 7(5):R938–48.
170. Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vécsei V, Schlegel J (2002). Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage* 10(1):62–70.
171. Schroeppe JP, Crist JD, Anderson HC, Wang J (2011). Molecular regulation of articular chondrocyte function and its significance in osteoarthritis. *Histol Histopathol* 26(3):377–94.
172. Scott A, Khan KM, Duronio V, Hart DA (2008). Mechanotransduction in Human Bone. *Sport Med* 38(2):139–160.
173. Sellam J, Herrero-beaumont G, Berenbaum F (2009). Osteoarthritis: pathogenesis , clinical aspects and diagnosis. EULAR Compend. pp 444–463
174. Shashidharamurthy R, Machiah D, Aitken JD, Putty K, Srinivasan G, Chassaing B, Parkos C a, Selvaraj P, Vijay-Kumar M (2012). Differential role of lipocalin-2 during immune-complex mediated acute and chronic inflammation. *Arthritis Rheum*. doi: 10.1002/art.37840
175. Shen J, Li J, Wang B, Jin H, Wang M, Zhang Y, Yang Y, Im H-J, O’Keefe R, Chen D (2013). Deletion of the transforming growth factor  $\beta$  receptor type II gene in articular chondrocytes leads to a progressive osteoarthritis-like phenotype in mice. *Arthritis Rheum* 65(12):3107–19.
176. Shen F, Ruddy MJ, Plamondon P, Gaffen SL (2005). Cytokines link osteoblasts and

- inflammation: microarray analysis of interleukin-17- and TNF-alpha-induced genes in bone cells. *J Leukoc Biol* 77(3):388–99.
177. Sheng MH-C, Zhou X-D, Bonewald LF, Baylink DJ, Lau K-HW (2013). Disruption of the insulin-like growth factor-1 gene in osteocytes impairs developmental bone growth in mice. *Bone* 52(1):133–44.
  178. Sickinger S, Maier H, König S, Vallant N, Kofler M, Schumpp P, Schwelberger H, Hermann M, Obrist P, Schneeberger S, Margreiter R, Troppmair J, Pratschke J, Aigner F (2013). Lipocalin-2 as mediator of chemokine expression and granulocyte infiltration during ischemia and reperfusion. *Transpl Int* 26(7):761–9.
  179. Simpson ER (2003). Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86(3-5):225–30.
  180. Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt K, Speed C, Jones M (2002). Aromatase--a brief overview. *Annu Rev Physiol* 64:93–127.
  181. Sims N a, Martin TJ (2014). Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep* 3(August 2013):481.
  182. Smith GN (2006). The role of collagenolytic matrix metalloproteinases in the loss of articular cartilage in osteoarthritis. *Front Biosci* 11:3081–95.
  183. Smith MD (2011). The normal synovium. *Open Rheumatol J* 5:100–6.
  184. Smith MM, Cake MA, Ghosh P, Schiavinato A, Read RA, Little CB (2008). Significant synovial pathology in a meniscectomy model of osteoarthritis: modification by intra-articular hyaluronan therapy. *Rheumatology (Oxford)* 47(8):1172–8.
  185. Smith E, Redman R a, Logg CR, Coetzee G a, Kasahara N, Frenkel B (2000). Glucocorticoids inhibit developmental stage-specific osteoblast cell cycle. Dissociation of cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 from E2F4-p130 complexes. *J Biol Chem* 275(26):19992–20001.
  186. Smith MD, Triantafillou S, Parker A, Youssef PP, Coleman M (1997). Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early

- osteoarthritis. *J Rheumatol* 24(2):365–71.
187. Söder S, Roach HI, Oehler S, Bau B, Haag J, Aigner T (2006). MMP-9/gelatinase B is a gene product of human adult articular chondrocytes and increased in osteoarthritic cartilage. *Clin Exp Rheumatol* 24(3):302–4.
188. Sohn DH, Sokolove J, Sharpe O, Erhart JC, Chandra PE, Lahey LJ, Lindstrom TM, Hwang I, Boyer KA, Andriacchi TP, Robinson WH (2012). Plasma proteins present in osteoarthritic synovial fluid can stimulate cytokine production via Toll-like receptor 4. *Arthritis Res Ther* 14(1):R7.
189. Sokoloff L (1993). Microcracks in the calcified layer of articular cartilage. *Arch Pathol Lab Med* 117(2):191–5.
190. Srinivasan G, Aitken JD, Zhang B, Carvalho F a, Chassaing B, Shashidharamurthy R, Borregaard N, Jones DP, Gewirtz AT, Vijay-Kumar M (2012). Lipocalin 2 deficiency dysregulates iron homeostasis and exacerbates endotoxin-induced sepsis. *J Immunol* 189(4):1911–9.
191. Srivastava KC, Mustafa T (1992). Ginger (*Zingiber officinale*) in rheumatism and musculoskeletal disorders. *Med Hypotheses* 39(4):342–8.
192. Stankovic A, Slavic V, Stamenkovic B, Kamenov B, Bojanovic M, Mitrovic DR (2009). Serum and synovial fluid concentrations of CCL2 (MCP-1) chemokine in patients suffering rheumatoid arthritis and osteoarthritis reflect disease activity. *Bratisl Lek Listy* 110(10):641–6.
193. Stürmer T, Sun Y, Sauerland S, Zeissig I, Günther KP, Puhl W, Brenner H (1998). Serum cholesterol and osteoarthritis. The baseline examination of the Ulm Osteoarthritis Study. *J Rheumatol* 25(9):1827–32.
194. Suarez A, Villalvilla A, Herrero-beaumont G, Largo R, Young DA, Gómez R (2013). Visfatin: a new player in rheumatic diseases. *Immunometabolism* 1:10–15.
195. Sudo H, Kodama H a, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S (1983). In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 96(1):191–8.
196. Suekawa M, Ishige A, Yuasa K, Sudo K, Aburada M, Hosoya E (1984).

- Pharmacological studies on ginger. I. Pharmacological actions of pungent constituents, (6)-gingerol and (6)-shogaol. *J Pharmacobiodyn* 7(11):836–48.
197. Sylvia VL, Gay I, Hardin R, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z (2002). Rat costochondral chondrocytes produce 17 $\beta$ -estradiol and regulate its production by 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ . *Bone* 30(1):57–63.
198. Takeuchi S, Mukai N, Tateishi T, Miyakawa S (2007). Production of sex steroid hormones from DHEA in articular chondrocyte of rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(1):E410–5.
199. Tamasi JA, Vasilov A, Shimizu E, Benton N, Johnson J, Bitel CL, Morrison N, Partridge NC (2013). Monocyte chemoattractant protein-1 is a mediator of the anabolic action of parathyroid hormone on bone. *J Bone Miner Res* 28(9):1975–86.
200. Therkleson T (2010). Ginger compress therapy for adults with osteoarthritis. *J Adv Nurs* 66(10):2225–33.
201. Tonge DP, Pearson MJ, Jones SW (2014). The hallmarks of osteoarthritis and the potential to develop personalised disease-modifying pharmacological therapeutics. Osteoarthritis Cartilage. doi: 10.1016/j.joca.2014.03.004
202. Triantaphyllidou I-E, Kalyvioti E, Karavia E, Lilis I, Kypreos KE, Papachristou DJ (2013). Perturbations in the HDL metabolic pathway predispose to the development of osteoarthritis in mice following long-term exposure to western-type diet. *Osteoarthritis Cartilage* 21(2):322–30.
203. Troeberg L, Nagase H (2012). Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta* 1824(1):133–45.
204. Tsezou A, Iliopoulos D, Malizos KN, Simopoulou T (2010). Impaired expression of genes regulating cholesterol efflux in human osteoarthritic chondrocytes. *J Orthop Res* 28(8):1033–9.
205. Tsuchiya A, Yano M, Tocharus J, Kojima H, Fukumoto M, Kawaichi M, Oka C (2005). Expression of mouse HtrA1 serine protease in normal bone and cartilage and its upregulation in joint cartilage damaged by experimental arthritis. *Bone* 37(3):323–36.



- 
206. Ulivi V, Tutolo G, Mallein-Gerin F, Daga A, Cancedda R, Cancedda FD (2006). A common pathway in differentiation and inflammation: p38 mediates expression of the acute phase SIP24 iron binding lipocalin in chondrocytes. *J Cell Physiol* 206(3):728–37.
207. Umlauf D, Frank S, Pap T, Bertrand J (2010). Cartilage biology, pathology, and repair. *Cell Mol Life Sci* 67(24):4197–211.
208. Ushiyama T, Ueyama H, Inoue K, Ohkubo I, Hukuda S (1999). Expression of genes for estrogen receptors alpha and beta in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 7(6):560–6.
209. Vanwanseele B, Eckstein F, Knecht H, Stüssi E, Spaepen a (2002). Knee cartilage of spinal cord-injured patients displays progressive thinning in the absence of normal joint loading and movement. *Arthritis Rheum* 46(8):2073–8.
210. Venken K, Callewaert F, Boonen S, Vanderschueren D (2008). Sex hormones, their receptors and bone health. *Osteoporos Int* 19(11):1517–25.
211. Villalvilla A, Gómez R, Largo R, Herrero-Beaumont G (2013). Lipid transport and metabolism in healthy and osteoarthritic cartilage. *Int J Mol Sci* 14(10):20793–808.
212. Virzi GM, Clementi A, de Cal M, Cruz DN, Ronco C (2013). Genomics and biological activity of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in several clinical settings. *Blood Purif* 35(1-3):139–43.
213. Wang Y, Nishida S, Boudignon BM, Burghardt A, Elalieh HZ, Hamilton MM, Majumdar S, Halloran BP, Clemens TL, Bikle DD (2007). IGF-I receptor is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *J Bone Miner Res* 22(9):1329–37.
214. Wei Q-Y, Ma J-P, Cai Y-J, Yang L, Liu Z-L (2005). Cytotoxic and apoptotic activities of diarylheptanoids and gingerol-related compounds from the rhizome of Chinese ginger. *J Ethnopharmacol* 102(2):177–84.
215. Westacott CI, Webb GR, Warnock MG, Sims J V, Elson CJ (1997). Alteration of cartilage metabolism by cells from osteoarthritic bone. *Arthritis Rheum* 40(7):1282–91.

- 
216. Wojdasiewicz P, Poniatowski Ł a, Szukiewicz D (2014). The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm* 2014:561459.
217. Woolf AD, Pfleger B (2003). Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ* 81(9):646–56.
218. Wu G-J, Chen T-G, Chang H-C, Chiu W-T, Chang C-C, Chen R-M (2007). Nitric oxide from both exogenous and endogenous sources activates mitochondria-dependent events and induces insults to human chondrocytes. *J Cell Biochem* 101(6):1520–31.
219. Xu G, Ahn J, Chang S, Eguchi M, Ogier A, Han S, Park Y, Shim C, Jang Y, Yang B, Xu A, Wang Y, Sweeney G (2012). Lipocalin-2 induces cardiomyocyte apoptosis by increasing intracellular iron accumulation. *J Biol Chem* 287(7):4808–17.
220. Yamasaki K, Hagiwara H (2009). Excess iron inhibits osteoblast metabolism. *Toxicol Lett* 191(2-3):211–5.
221. Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, Moses M a (2001). The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *J Biol Chem* 276(40):37258–65.
222. Yan Q, Yang Q, Mody N, Graham TE, Hsu C, Xu Z, Houstis NE, Kahn BB, Rosen ED (2007). The adipokine lipocalin 2 is regulated by obesity and promotes insulin resistance. *Diabetes* 56(10):2533–40.
223. Yue W, Berstein LM, Wang JP, Clark GM, Hamilton CJ, Demers LM, Santen RJ (2001). The potential role of estrogen in aromatase regulation in the breast. *J Steroid Biochem Mol Biol* 79(1-5):157–64.
224. Zerega B, Cermelli S, Michelis B, Cancedda R, Cancedda FD (2000). Expression of NRL/NGAL (neu-related lipocalin/neutrophil gelatinase-associated lipocalin) during mammalian embryonic development and in inflammation. *Eur J Cell Biol* 79(3):165–72.
225. Zhang J, Wu Y, Zhang Y, Leroith D, Bernlohr D a, Chen X (2008). The role of

- lipocalin 2 in the regulation of inflammation in adipocytes and macrophages. *Mol Endocrinol* 22(6):1416–26.
226. Zhang M, Xuan S, Bouxsein ML, von Stechow D, Akeno N, Faugere MC, Malluche H, Zhao G, Rosen CJ, Efstratiadis A, Clemens TL (2002). Osteoblast-specific knockout of the insulin-like growth factor (IGF) receptor gene reveals an essential role of IGF signaling in bone matrix mineralization. *J Biol Chem* 277(46):44005–12.
227. Zhang L-Z, Zheng H-A, Jiang Y, Tu Y-H, Jiang P-H, Yang A-L (2012). Mechanical and biologic link between cartilage and subchondral bone in osteoarthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 64(7):960–7.
228. Zhen G, Wen C, Jia X, Li Y, Crane JL, Mears SC, Askin FB, Frassica FJ, Chang W, Yao J, Carrino JA, Cosgarea A, Artemov D, Chen Q, Zhao Z, Zhou X, Riley L, Sponseller P, Wan M, et al (2013). Inhibition of TGF- $\beta$  signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis. *Nat Med* 19(6):704–12.
229. Zhuo Q, Yang W, Chen J, Wang Y (2012). Metabolic syndrome meets osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 8(12):729–37.
230. Zick SM, Djuric Z, Ruffin MT, Litzinger AJ, Normolle DP, Alrawi S, Feng MR, Brenner DE (2008). Pharmacokinetics of 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, and 6-shogaol and conjugate metabolites in healthy human subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17(8):1930–6.

## **VIII. APORTACIONES CIENTÍFICAS**

El trabajo presentado en esta tesis doctoral ha sido parcialmente publicado en los siguientes artículos científicos:

**Villalvilla A**, da Silva JA, Largo R, Gualillo O, Vieira PC, Herrero-Beaumont G, Gómez R. 6-Shogaol inhibits chondrocytes' innate immune responses and cathepsin-K activity. *Mol. Nutr. Food Res.* 2014;58:256–66.

Lugo L, **Villalvilla A**, Gómez R, Bellido M, Sánchez-Pernaute O, Largo R, Herrero-Beaumont G, Roman-Blas JA. Effects of PTH [1-34] on synoviopathy in an experimental model of osteoarthritis preceded by osteoporosis. *Osteoarthritis Cartilage* 2012;20:1619–30.

**Villalvilla A**, Gomez R, Lugo L, Lopez-Oliva F, Largo R, Herrero-Beaumont G. Aromatase expression in human chondrocytes: an induction due to culture. Enviado.

LCN2 exhibits catabolic activities in osteoblasts. En preparación.

### Otras publicaciones científicas:

Gómez R, **Villalvilla A**, Largo R, Gualillo O, Herrero-Beaumont G. Is Toll-like Receptor 4 a potential target for osteoarthritis treatment? *Nat. Rev. Rheumatol.* Aceptado.

**Villalvilla A**, Gomez R, Roman-Blas JA, Largo R, Herrero-Beaumont G. SDF-1 signaling: a promising target in rheumatic diseases. *Expert Opin. Ther. Targets* 2014;:1–11.

Lugo L, **Villalvilla A**, Largo R, Herrero-Beaumont G, Roman-Blas JA. Selective estrogen receptor modulators (SERMs): new alternatives for osteoarthritis? *Maturitas* 2014;77:380–4.

**Villalvilla A**, Gómez R, Largo R, Herrero-Beaumont G. Lipid transport and metabolism in healthy and osteoarthritic cartilage. *Int J Mol Sci*. 2013;14:20793–808.

Suarez A, **Villalvilla A**, Herrero-beaumont G, Largo R, Young DA, Gómez R. Visfatin: a new player in rheumatic diseases. *Immunometabolism* 2013;1:10–5.

**Villalvilla A**, Moro M, Arruza L, Redondo S, Fernández-Cruz A, Fernández-Durango R. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in rat oxygen-induced retinopathy despite a retinal SDF-1/CXCR4 and VEGF proangiogenic response. *Life Sci*. 2012;91:264–70.

**Villalvilla A**, Fernández-Durango R. Células progenitoras del endotelio: su posible potencial en la terapia celular de la retina isquémica. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2010;85:291–3.

### **Comunicaciones a congresos internacionales:**

**Villalvilla A.**, Gómez R., Largo R., Herrero-Beaumont G., Lugo L. Human articular chondrocytes from elderly osteoarthritic woman synthesize local estradiol through steroidogenesis reactions catalyzed by aromatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase.

Tipo de participación: Poster.

39th Annual Congress of the European Calcified Tissue Society. Estocolmo (Suecia), Mayo 2012.

**Villalvilla A**, Almada J, Vieira PC, Largo R, Herrero-Beaumont G, Gómez R. Anti-inflammatory and anti-resorptive properties of ginger derivatives.

Tipo de participación: Poster.

39th Annual Congress of the European Calcified Tissue Society. Estocolmo (Suecia), Mayo 2012.

Andrés-Bergós J., Tardío L., **Villalvilla A.**, Gómez R., Herrero-Beaumont G., Largo R. O-GlcNAc protein modification stimulates chondrogenesis in vitro and chondrocyte hypertrophy in mouse.

Tipo de participación: Poster.

2012 World Congress on Osteoarthritis OARSI. Barcelona (España), Abril 2012.

Lugo L., **Villalvilla A.**, Gómez R., Largo R., Herrero-Beaumont G. Functional estrogen biosynthesis machinery is expressed in human postmenopausal osteoarthritis chondrocytes.

Tipo de participación: Poster.

2012 World Congress on Osteoarthritis OARSI. Barcelona (España), Abril 2012.

**Villalvilla A.**, Almada J., Vieira P.C., Largo R., Herrero-Beaumont G., Gomez R. 6-Shogaol inhibits cathepsin-K activity and has anticatabolic and anti-inflammatory properties in stimulated chondrocytes.

Tipo de participación: Póster.

32nd European Workshop for Rheumatology Research. Estocolmo (Suecia), Marzo 2012.

**Villalvilla A.**, Moro M., Arruza L., Villar G., Redondo S., Herranz G., Fernández-Cruz A., Fernández-Durango R. The role of endothelial progenitor cells in neovascularization of ischemic retina through SDF-1/CXCR4 axis in an oxygen-induced retinopathy rat model.

Tipo de participación: Presentación oral de Póster.

3rd Congress of the European Academy of Paediatric Societies 2010. Copenhagen (Dinamarca), Octubre 2010.

## RESEARCH ARTICLE

# 6-Shogaol inhibits chondrocytes' innate immune responses and cathepsin-K activity

Amanda Villalvilla<sup>1\*</sup>, Jame's A. da Silva<sup>2,4\*</sup>, Raquel Largo<sup>1</sup>, Oreste Gualillo<sup>3</sup>, Paulo Cezar Vieira<sup>2</sup>, Gabriel Herrero-Beaumont<sup>1</sup> and Rodolfo Gómez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Osteoarticular Pathology Lab, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Avda Reyes Católicos, Madrid, Spain

<sup>2</sup> Department of Chemistry, Laboratory of Natural Products, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP, Brazil

<sup>3</sup> SERGAS, Santiago University Clinical Hospital Research laboratory 9 (NEIRID LAB), Institute of Medical Research (IDIS), Santiago de Compostela, Spain

<sup>4</sup> Núcleo de Farmácia, Federal University of Sergipe, Lagarto, SE, Brazil

**Scope:** Ginger has long been used in traditional Asian medicine to treat osteoarthritis. Indeed, scientific research has reported that ginger derivatives (GDs) have the potential to control innate immune responses. Given the widespread use and demonstrated properties of GDs, we set out to study their anti-inflammatory and anticatabolic properties in chondrocytes.

**Methods and results:** 6-shogaol (6-S), the most active GD, was obtained from ginger. 6-S was not toxic as measured by MTT assay, and inhibited NO production and IL-6 and MCP-1 induced gene expression in LPS but not in IL-1 $\beta$ -stimulated chondrocytes. 6-S also inhibited LPS-mediated ERK1/2 activation as well as NOS2 and MyD88 induced expression as determined by Western blot. Moreover, zymography revealed that 6-S inhibited matrix metalloproteinases (MMP) 2/9 induction in LPS-treated cells. Hydrated 6-S was modified to obtain a compound (SSi6) without 6-S potential anti-inflammatory properties. Both 6-S and SSi6 inhibited cathepsin-K activity.

**Conclusion:** 6-S blocked TLR4-mediated innate immune responses and MMP induction in chondrocytes. These results, together with GDs-mediated cathepsin-K inhibition, suggest the potential for GDs use against cartilage and bone degradation. Therefore, considering that clinical trials involving oral administration of ginger achieved relevant nontoxic GDs serum concentrations, we suggest that a ginger-supplemented diet might reduce OA symptoms.

**Keywords:**

Chondrocytes / Ginger / Inflammation / Osteoarthritis / TLRs



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

**Correspondence:** Dr. Rodolfo Gómez Bahamonde, Osteoarticular Pathology Lab, IIS-Fundación Jiménez Díaz. Av. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain

**E-mail:** rodolfobahamonde@gmail.com

**Fax:** +34-91-544-2636

**Abbreviations:** 6-S, 6-shogaol; ERK, extracellular signal-regulated kinases; FBS, fetal bovine serum; GD, ginger derivative; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MMP, matrix metalloproteinase; MTT, methyl-thiazolyl-tetrazolium; MyD88, myeloid differentiation primary response gene (88); NO, nitric oxide; NOS2, nitric oxide synthase 2; OA, osteoarthritis; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; TLR, toll-like receptor

## 1 Introduction

Osteoarthritis (OA), the most common rheumatic disease, is characterized by joint space narrowing due to progressive cartilage degradation. These articular disturbances cause severe joint alterations such as loss of joint architecture, pain, and disability. Although OA etiology is not yet fully understood, it has been suggested that OA could be mediated by chondrocyte inflammatory responses [1]. IL-1 $\beta$  has been implicated in these responses being strongly associated with catabolic and inflammatory processes in OA patients [2]. However, despite that, therapeutic approaches targeting IL-1 $\beta$  failed to control OA symptoms [3]. In consequence, there is a growing

\*These authors contributed equally to this work.

Received: December 17, 2012

Revised: June 8, 2013

Accepted: June 30, 2013



# Osteoarthritis and Cartilage



## Effects of PTH [1-34] on synoviopathy in an experimental model of osteoarthritis preceded by osteoporosis

L. Lugo, A. Villalvilla, R. Gómez, M. Bellido, O. Sánchez-Pernaute, R. Largo, G. Herrero-Beaumont, J.A. Roman-Blas\*

Bone and Joint Research Unit, Rheumatology Service, IIS Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma, Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 February 2012

Accepted 18 August 2012

#### Keywords:

Osteoarthritis

Osteoporosis

Synovitis

Cartilage damage

### SUMMARY

**Purpose:** Synoviopathy contributes to cartilage degradation in osteoarthritis (OA). Intermittent parathyroid hormone (PTH) [1-34] administration inhibits terminal differentiation of human chondrocytes and prevents cartilage damage. We aimed to determine whether PTH [1-34] could modify synovial changes in experimental OA preceded by osteoporosis (OP).

**Methods:** Twenty osteoporosis (OP) rabbits underwent knee surgery to induce OA. They were administered either saline vehicle or PTH for 10 weeks. Ten healthy rabbits were used as controls. Following sacrifice, synovial changes were assessed by Krenn synovitis score, immunohistochemistry for macrophages (RAM-11), B and T lymphocytes, type I collagen, parathyroid hormone 1 receptor (PTH1R), and anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Synovial mRNA levels of Col1A1, IL-1 $\beta$ , cyclooxygenase 2 (COX-2), matrix-degrading metalloproteinases (MMP-9, MMP-13), and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), as well as protein expression of PTH1R were also determined. Cartilage damage was analyzed by Mankin score.

**Results:** OPOA + vehicle rabbits showed an increase in synovitis score vs controls ( $P = 0.003$ ), mainly due to synovial hyperplasia and fibrosis, while PTH reduced these changes ( $P = 0.017$ ). Mankin and Krenn scores were well correlated in all groups ( $r = 0.629$ ,  $P = 0.012$ ). Immunostaining for RAM-11 and B lymphocytes was increased ( $P \leq 0.05$ ), whereas PTH1R protein levels tended to be higher in OPOA + vehicle animals vs controls. PTH did not modify RAM-11 staining or PTH1R levels; however, it restored PTH1R localization to the vicinity of synovial vessels. PTH also decreased type I collagen, MCP-1, and MMP-13 expression ( $P < 0.05$ ), as well as PCNA staining compared to vehicle-treated OPOA rabbits.

**Conclusions:** In our model of OA aggravated by previous OP, synoviopathy correlated well with cartilage damage. Intermittent PTH [1-34] administration ameliorated both hyperplasia and fibrosis.

© 2012 Osteoarthritis Research Society International. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

### Introduction

Osteoarthritis (OA) has been recently established as a disease that affects the whole joint, including not only the articular cartilage and subchondral bone but also the synovial membrane<sup>1,2</sup>. In fact, advanced noninvasive imaging techniques such as magnetic resonance imaging (MRI) and ultrasonography (US) have made possible the identification of synovial changes that occur in both patients undergoing joint replacement surgery and patients with early OA not clinically detected<sup>3</sup>.

Relevant histological changes have been frequently identified in the synovium of OA patients. Mild synovial hyperplasia with proliferation and activation of lining cells is mostly present in early OA<sup>4,5</sup>. Fibrotic changes may be early observed in subsynovial stroma, often accompanying synovial villi hyperplasia<sup>6</sup>. Further shortening and thickening of the joint capsule, a phenomenon which is partially responsible for articular stiffness happens in late-stage OA disease<sup>4</sup>. Afterwards, bone and cartilage fragments are embedded in the synovial membrane during the end stage of the disease. Fibrinous exudates at the surface of synovial membrane and a minor inflammatory cell infiltrate have been described in this late synoviopathy<sup>7</sup>. Synovial inflammatory infiltrates appear in far less abundance than in rheumatoid arthritis (RA) synovium, distributed in a patchy pattern and mostly confined to areas adjacent to sites of damaged cartilage, thus increasing OA severity throughout the disease process<sup>8,9</sup>. Activated macrophages are major components of synovial OA infiltrates, although T and B cells are also observed in OA synovium<sup>3,7,10,11</sup>.

\* Address correspondence and reprint requests to: J.A. Roman-Blas, Bone and Joint Research Unit, Fundación Jiménez Díaz, Avda Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain. Tel: 34-91-550-49-18; Fax: 34-91-544-2636.

E-mail addresses: llugo@fjd.es (L. Lugo), amanda.villalvilla@fjd.es (A. Villalvilla), rodolfo.gomez@fjd.es (R. Gómez), miriambellido@hotmail.com (M. Bellido), osanchez@fjd.es (O. Sánchez-Pernaute), rlargo@fjd.es (R. Largo), gherrero@fjd.es (G. Herrero-Beaumont), jaromanblas@gmail.com (J.A. Roman-Blas).

# EXPERT OPINION

1. Introduction
2. SDF-1 in RA
3. SDF-1 in OA
4. Same molecule for different pathologies
5. Targeting SDF-1 signaling
6. Conclusion
7. Expert opinion

## SDF-1 signaling: a promising target in rheumatic diseases

Amanda Villalvilla, Rodolfo Gomez, Jorge A Roman-Blas, Raquel Largo & Gabriel Herrero-Beaumont<sup>†</sup>

<sup>†</sup>*Bone and Joint Research Unit, IIS - Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain*

**Introduction:** Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) is a potent chemoattractant cytokine with various biological functions such as stem cell mobilization, inflammatory cell infiltration and angiogenesis. Therefore, it has also been implicated in several pathological processes, from ischemic conditions to cancer. Remarkably, SDF-1 and its receptors, CXCR4 and CXCR7, are also present in joint tissues, where they play a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA).

**Areas covered:** This review summarizes the physiological and pathological role of SDF-1 signaling and its involvement in RA and OA. That includes synovial inflammation, bone erosion, cartilage degradation and increased bone turnover. Although this cytokine could play different roles in these rheumatic diseases, specific and differentiated therapeutic targets in each process can be identified. Current therapeutic strategies to block SDF-1 signaling in several diseases and their possible use in rheumatic diseases are also discussed.

**Expert opinion:** Emerging drugs that block CXCR4 or CXCR7 in different disorders may represent promising therapies for rheumatic disease via inhibition of key pathological events involved in the progression of RA and OA.

**Keywords:** bone, cartilage, chondrocyte, CXCL12, CXCR4, CXCR7, osteoarthritis, osteoclast, rheumatoid arthritis, stromal cell-derived factor 1, synoviocyte, synovium

*Expert Opin. Ther. Targets [Early Online]*

### 1. Introduction

Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1), also known as CXCL12, belongs to the CXC chemokine subfamily. It is widely involved in the hematopoietic system, being essential for B-cell lymphopoiesis and bone marrow myelopoiesis [1]. This chemokine is considered the most potent chemoattractant of hematopoietic progenitor cells [2]. In fact, SDF-1 is necessary for migration of hematopoietic stem cells between embryonic hematopoietic sites [1] and for their mobilization from bone marrow. Several enzymes, such as cathepsins and MMPs, regulate these processes by establishing chemokine gradients via SDF-1 degradation [3,4].

SDF-1 is mainly expressed by bone marrow stromal cells and endothelial cells across many organs [5,6]. Its production is increased under ischemic conditions, such as myocardial infarction [7] and ischemic retinopathy [8], to promote angiogenesis and tissue repair. Interestingly, SDF-1 is also expressed in periosteum and recruits mesenchymal stem cells during endochondral bone repair [9]. However, SDF-1 is also expressed by tumor cells, where it promotes angiogenesis and, therefore, enables tumor survival and growth [10].

The most important actions of SDF-1 occur through its main receptor CXCR4, which was independently described by two groups [11,12]. CXCR4 is a seven-transmembrane-domain G-protein-coupled receptor and it was the first identified co-receptor for HIV-1 surface protein gp120 [13]. Subsequently, this receptor has been found in hematopoietic cells, progenitor cells and cancer cells, as well as chondrocytes and fibroblast-like synoviocytes (FS) [14]. Once SDF-1 binds to CXCR4, it

**informa**  
healthcare



## Mini review

# Selective estrogen receptor modulators (SERMs): New alternatives for osteoarthritis?



L. Lugo, A. Villalvilla, R. Largo, G. Herrero-Beaumont, J.A. Roman-Blas\*

*Bone and Joint Research Unit, Rheumatology Service, IIS Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma, Madrid, Spain*

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 26 October 2013

Received in revised form 20 January 2014

Accepted 22 January 2014

## Keywords:

Hormone therapy

Estrogen receptors

Osteoarthritis

Selective estrogen receptor modulators

## ABSTRACT

The dramatic rise in the prevalence rate of osteoarthritis (OA) after the menopause and the presence of estrogen receptors in joint tissues suggest that estrogen may help protect against the development of OA. Trials of estrogen therapy have produced inconclusive results, however, partly because of flaws in study design and partly because of the complexity of the mechanisms underlying estrogen's effects on joint tissues. Initial studies of the use of selective estrogen receptor modulators (SERMs) have reported beneficial effects in OA. These agents may exert both a direct effect upon joint cartilage and indirect effects on subchondral bone, synovium, muscle, tendons and ligaments. SERMs may be particularly beneficial for postmenopausal patients with osteoporotic OA, a phenotype defined by decreased bone density, associated with high remodeling in subchondral bone. More research is needed, though, before SERMs can become a therapeutic option for OA.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## Contents

1. Introduction .....	380
2. Estrogen therapy: current evidence .....	381
2.1. Human studies .....	381
2.2. In vivo studies .....	381
3. Selective estrogen receptor modulators (SERMs): Encouraging data .....	382
3.1. Human studies .....	382
3.2. In vivo studies .....	382
4. Development of novel SERMs and selective estrogen ligands .....	383
5. Conclusions .....	383
6. Practice points .....	383
7. Research agenda .....	383
Contributors .....	383
Competing interests .....	383
Funding .....	383
Provenance and peer review .....	383
Acknowledgments .....	383
References .....	383

## 1. Introduction

Osteoarthritis (OA) is a chronic progressive disorder that affects the whole joint and finally leads to organ failure. Genetic factors, as well as hormone-dependent and age-related factors such as obesity, local mechanical factors and acute injury, promote molecular, biochemical and biomechanical changes in any joint tissue, leading to joint tissue damage and failure of repair [1,2].

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 550 49 18; fax: +34 91 544 2636.

E-mail addresses: [llugo@fjd.es](mailto:llugo@fjd.es) (L. Lugo), [avillalvilla@fjd.es](mailto:avillalvilla@fjd.es)(A. Villalvilla), [rlargo@fjd.es](mailto:rlargo@fjd.es) (R. Largo), [gherrero@fjd.es](mailto:gherrero@fjd.es)(G. Herrero-Beaumont), [jaromanblas@gmail.com](mailto:jaromanblas@gmail.com) (J.A. Roman-Blas).

Review

## Lipid Transport and Metabolism in Healthy and Osteoarthritic Cartilage

Amanda Villalvilla <sup>1,\*</sup>, Rodolfo Gómez <sup>2</sup>, Raquel Largo <sup>1</sup> and Gabriel Herrero-Beaumont <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Osteoarticular Pathology Laboratory, IIS Fundación Jiménez Díaz, Madrid 28040, Spain; E-Mails: rlargo@fjd.es (R.L.); gherrero@fjd.es (G.H.-B.)

<sup>2</sup> Musculoskeletal Research Group, Institute of Cellular Medicine, Newcastle University, Newcastle upon Tyne NE2 4HH, UK; E-Mail: rodolfo.gomez@newcastle.ac.uk

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: amanda.villalvilla@fjd.es; Tel.: +34-915-504-800; Fax: +34-915-442-636.

Received: 23 August 2013; in revised form: 8 October 2013 / Accepted: 8 October 2013 / Published: 16 October 2013

---

**Abstract:** Cartilage is an avascular tissue and cartilage metabolism depends on molecule diffusion from synovial fluid and subchondral bone. Thus, nutrient availability is limited by matrix permeability according to the size and charge of the molecules. Matrix composition limits the access of molecules to chondrocytes, determining cell metabolism and cartilage maintenance. Lipids are important nutrients in chondrocyte metabolism and are available for these cells through *de novo* synthesis but also through diffusion from surrounding tissues. Cartilage status and osteoarthritis development depend on lipid availability. This paper reviews lipid transport and metabolism in cartilage. We also analyze signalling pathways directly mediated by lipids and those that involve mTOR pathways, both in normal and osteoarthritic cartilage.

**Keywords:** chondrocyte; cartilage; osteoarthritis; lipid; cholesterol; nutrition

---

### 1. Introduction

Lipid content in cartilage has been studied for many years. In the 1960s, Stockwell found that lipids in articular cartilage account for 1%, although this content was not modulated by age or sex [1]. While glucose is the main source of energy in chondrocytes [2], lipids in cartilage are necessary for cells as a source of energy but also to be incorporated as structural components and signalling molecules.

# Visfatin: a new player in rheumatic diseases

## Abstract

During the last 50 years the number of overweight and obese people in developed countries has increased dramatically. The consequences of this excessive fat accumulation have been associated with a multitude of co-morbidities, mainly related to the cardiovascular system and glucose and lipid metabolism. However, obesity also has an impact on other diseases, as an enhancer of certain pathological aspects or as a susceptibility factor, including certain rheumatic diseases such as rheumatoid arthritis (RA), osteoarthritis (OA) and systemic lupus erythematosus (SLE). The link between obesity and these rheumatic diseases has been purported to be via the action of metabolic factors produced by adipose tissue, adipokines. Among these adipokines are leptin and adiponectin, which have been extensively studied. Our knowledge of the role of other relevant newer adipokines, such as visfatin, in the arthritides is rapidly growing. Therefore, in this review our aim is to summarize the current literature regarding the association between visfatin and the most relevant rheumatic diseases.

## Keywords

Visfatin • Adipokines • Osteoarthritis • Rheumatoid arthritis • Cartilage

© Versita Sp. z o.o.

Rodolfo Gómez<sup>1\*</sup>,  
Ana Suarez<sup>1</sup>,  
Amanda Villalvilla<sup>2</sup>,

Gabriel Herrero-Beaumont<sup>2</sup>,  
Raquel Largo<sup>2</sup>,  
David A. Young<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Musculoskeletal Research Group,  
Institute of Cellular Medicine,  
4th Floor Catherine Cookson Building,  
The Medical School, Newcastle University,  
Newcastle upon Tyne, NE2 4HH, UK

<sup>2</sup>Osteoarticular pathology laboratory,  
Institute Fundación Jiménez Díaz,  
Fundación Jiménez Díaz,  
Ave. Reyes Católicos,  
Madrid, Spain

Received 14 April 2013

Accepted 02 May 2013

## Introduction

Visfatin, also known as pre-B-colony enhancing factor (PBEF) and nicotinamide phosphorybosil transferase (NAMPT), is a highly conserved 52-kDa protein that is mainly expressed in human bone marrow, liver tissue, and muscle [1]. Additionally, it is also produced by adipocytes [2], and is thus considered as a new adipokine.

Although visfatin expression is not limited to adipocytes, this adipokine is highly produced in the visceral adipose tissue of both humans and mice [2], with increased levels associated with obesity [2]; a finding which, although still somewhat controversial, has been confirmed in numerous studies performed in humans of various ethnicities and ages [3–6]. Furthermore, the serum concentration of visfatin can be reduced by regular physical exercise [4,7] or after bariatric surgery-induced weight loss [3]. In addition, very recent work has supported the notion that visceral adipose tissue is an important source of visfatin in obese patients, since visfatin concentration has been found to be higher in the portal vein than in systemic veins [6].

Visfatin is best characterised by its NAD biosynthetic enzyme activity in which visfatin synthesizes nicotinamide mononucleotide (NMN) from nicotinamide in the NAD<sup>+</sup> biosynthetic pathway [8]. It has also been suggested to bind to, and activate, the insulin receptor having effects similar to insulin in vivo and in vitro [2]. However, the validity of published data regarding its insulin-mimetic properties is under debate

[9,10]. Despite this, it has been described that visfatin potentiated glucose-stimulated insulin secretion by pancreatic human islets [11] and elevated plasma levels of visfatin have been found in patients with type 2 [12,13] and type 1 diabetes mellitus [7]. Moreover, the induction of insulin resistance in healthy male volunteers significantly increased serum visfatin levels [14].

Despite these controversies, visfatin's association with certain co-morbidities of rheumatic diseases such as obesity, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance (IR), metabolic syndrome, and cardiovascular disease, have been recently confirmed by an extensive metadata analysis [15]. Likewise, visfatin plasma concentrations may also be related to lipid metabolism [16] and with the inflammatory response [17] as indicated by a positive correlation with inflammatory marker C-reactive protein (CRP) [6,18].

In fact, visfatin has been shown to up-regulate pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and particularly IL-6 in vivo and in vitro [19]. Further studies have validated this pro-inflammatory potential of visfatin and its circulating-level positive-correlation with serum levels of IL-6 [5,18].

Since the discovery of adipokines, adipose tissue has no longer been considered as a simple fat deposit and is today considered a genuine endocrine organ. During obesity the excessive or aberrant accumulation of this tissue entails important endocrine and immune alterations, some of which have been linked with an imbalance in the local or systemic production of certain adipokines such as leptin and

\* E-mail: rodolfo.gomez@ncl.ac.uk